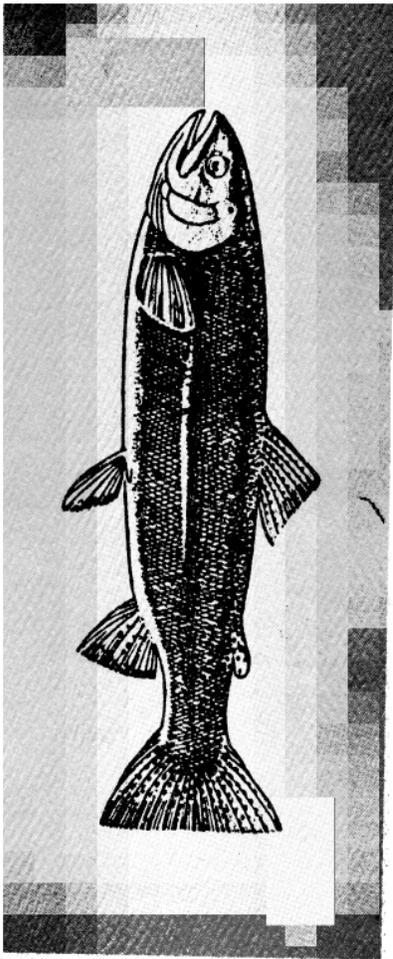


Série de la Protection de l'environnement



Méthode d'essai biologique:
essai de létalité aiguë sur la
truite arc-en-ciel

Rapport SPE 1/RM/9
Juillet 1990
(avec modifications de mai 1996)
(avec modifications de mai 2007)

Canada



Environnement
Canada

Environment
Canada

Méthode d'essai biologique: essai de létalité aiguë sur la truite arc-en-ciel

**Section de l'élaboration des méthodes et des applications
Centre de technologie environnementale
Environnement Canada**

**Rapport SPE 1/RM/9
Juillet 1990 (avec les modifications de mai 1996)**

Données de catalogue avant publication (Canada)

Vedette principale au titre:

Méthode d'essai biologique: essai de létalité
aiguë sur la truite arc-en-ciel

(Méthode générique; SPE 1/RM/9)

Publ. en anglais sous le titre: Biological test method,
acute lethality test using rainbow trout.

Comprend des références bibliogr.

ISBN 0-662-9601-6

No. de cat. MAS En49-24/1-9F

1. Hydrobiologie -- Aspect de l'environnement.
2. Truite arc-en-ciel -- Toxicologie. 3. Mer -- Pollution.
4. Environnement -- Surveillance -- Canada. I. Canada.
Direction générale de la protection de l'environnement. II. Canada.
Environnement Canada. III. Coll.: Rapport
(Canada. Environnement Canada); SPE 1/RM/9.
- IV. Titre: Essai de létalité aiguë sur la truite arc-en-ciel.

QH90.5714 1990 574.'92 C90-098697-2

Commentaires

Les personnes qui désirent faire part de leurs commentaires sur la teneur du présent rapport sont priées de les adresser à:

Richard Scroggins
Section de l'élaboration des méthodes et des applications
Centre de technologie environnementale
Environnement Canada
335 River Road
Ottawa (Ontario)
K1A 0H3

This report is also available in English under the title *Biological Test Method: Acute Lethality Test Using Rainbow Trout*. For copies, please contact:

Environmental Protection Publications
Environmental Technology Advancement Directorate
Environment Canada
Ottawa, Ontario
K1A 0H3

Résumé

*Le présent document expose les méthodes recommandées par Environnement Canada pour l'exécution d'essais de létalité sur la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*, auparavant *Salmo gairdneri*).*

Il présente les conditions et méthodes générales ou universelles permettant de réaliser des essais de létalité aiguë sur un large éventail de substances. Il précise d'autres conditions et méthodes propres à l'évaluation d'échantillons de produits chimiques, d'effluents, d'élutriats, de lixiviats ou de milieux récepteurs. Le lecteur y trouvera des instructions pour la détention et l'acclimatation des organismes soumis à l'essai, la manipulation et le stockage des échantillons, les installations d'essai requises, les méthodes de préparation des solutions d'essai et de mise en route des essais, les conditions prescrites pour les essais, les observations et mesures appropriées, les résultats des essais, les méthodes de calcul et l'utilisation de produits toxiques de référence.

Abstract

*Methods recommended by Environment Canada for performing acute lethality tests with rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, formerly named *Salmo gairdneri*) are described in this report.*

General or universal conditions and test procedures are outlined for undertaking an acute lethality test using a variety of test materials. Additional conditions and procedures are stipulated which are specific for assessing samples of chemicals, effluents, elutriates, leachates, or receiving waters. Included are instructions on holding and acclimating test organisms, sample handling and storage, test facility requirements, procedures for preparing test solutions and test initiation, specified test conditions, appropriate observations and measurements, endpoints, methods of calculation, and the use of reference toxicants.

Avant-propos

Le présent document fait partie d'une série de méthodes recommandées pour mesurer et évaluer les effets bioaquatiques de substances toxiques. Ces méthodes ont été évaluées par la Direction de la protection de l'environnement (DPE); elles sont recommandées pour les applications suivantes:

- *utilisation dans les laboratoires de toxicité aquatique d'Environnement Canada et des provinces;*
- *essais confiés en sous-traitance par Environnement Canada ou demandés à des organismes ou à des entreprises de l'extérieur;*
- *remplacement d'instructions plus précises, par exemple celles prévues dans les règlements; et*
- *fondement pour l'établissement d'instructions très explicites devant figurer, en certaines circonstances, dans un protocole juridique ou une méthode de référence normalisée.*

Les différents types d'essais compris dans cette série ont été choisis parce qu'ils sont acceptables aux fins des programmes de protection et de conservation environnementales d'Environnement Canada. Ces documents visent à fournir des lignes directrices et à faciliter l'utilisation de méthodes cohérentes, pertinentes et exhaustives pour recueillir des données sur les effets toxiques d'échantillons de produits chimiques, d'effluents, d'élutriats, de lixiviats et de milieux récepteurs.

Dans le présent document, la mention d'appellations commerciales ne constitue nullement une recommandation de la part d'Environnement Canada; d'autres produits de valeur semblable peuvent être utilisés.

Table des matières

Résumé	v
Abstract	vi
Avant-propos	vii
Liste des tableaux	xii
Liste des figures	xii
Liste des abréviations	xiii
Glossaire	xiv
Remerciements	xix

Section 1

Introduction	1
1.1 Contexte	1
1.2 Répartition de l'espèce et utilisation antérieure pour des essais	1

Section 2

Organismes soumis à l'essai	5
2.1 Espèce	5
2.2 Cycle biologique et taille	5
2.3 Source	5
2.4 Détention et acclimatation	5
2.4.1 Installations	5
2.4.2 Éclairage	7
2.4.3 Eau	7
2.4.4 Température	8
2.4.5 Oxygène dissous	8
2.4.6 pH	9
2.4.7 Alimentation	9
2.4.8 Nettoyage des réservoirs	9
2.4.9 Morbidité, mortalité et traitement des poissons	9

Section 3

Système d'essai	11
3.1 Installations	11
3.2 Éclairage	11
3.3 Réservoirs d'essai	11
3.4 Eau de contrôle/de dilution	11

Section 4

Méthode d'essai universelles	13
4.1 Préparation des solutions d'essai	13
4.2 Mise en route de l'essai	13

4.3	Conditions de l'essai	17
4.3.1	Oxygène dissous et aération	17
4.3.2	pH	18
4.4	Observations et mesures	19
4.5	Résultats et calculs	20
4.6	Produits toxiques de référence	21
4.7	Considérations juridiques	24

Section 5

Méthodes particulières pour l'essai de produits chimiques	25	
5.1	Propriétés, étiquetage, transport et stockage des échantillons	25
5.2	Préparation des solutions d'essai	25
5.3	Eau de contrôle/de dilution	26
5.4	Observations et mesures	27
5.5	Résultats et calculs	27

Section 6

Méthodes particulières pour l'essai d'échantillons d'effluents, d'élutriats et de lixiviats	28	
6.1	Étiquetage, transport et stockage des échantillons	28
6.2	Préparation des solutions d'essai	28
6.3	Eau de contrôle/de dilution	29
6.4	Conditions de l'essai	29
6.5	Observations et mesures	30
6.6	Résultats et calculs	31

Section 7

Méthodes particulières pour l'essai d'échantillons d'eau de milieux récepteurs	32	
7.1	Étiquetage, transport et stockage des échantillons	32
7.2	Préparation des solutions d'essai	32
7.3	Eau de contrôle/de dilution	32
7.4	Observations et mesures	33
7.5	Résultats et calculs	33

Section 8

Procès-verbal de l'essai	34	
8.1	Substance à expérimenter	34
8.2	Organismes soumis à l'essai	34
8.3	Installations et appareils	35
8.4	Eau de contrôle/de dilution	35
8.5	Méthode d'essai	35
8.6	Conditions de l'essai	35
8.7	Résultats de l'essai	36

Références	37
<i>Annexe A</i>	
Membres du Groupe intergouvernemental de la toxicité environnementale et les adresses de l'administration centrale et des bureaux régionaux d'Environnement Canada	41
<i>Annexe B</i>	
Écarts de méthodologie pour l'exécution d'essais de létalité aigüe sur la truite arc-en-ciel	43
<i>Annexe C</i>	
Guide d'alimentation quotidienne de la truite arc-en-ciel pendant la détention et l'acclimatation	49
<i>Annexe D</i>	
Série logarithmique de concentrations convenant aux essais de toxicité	50
<i>Annexe E</i>	
Termes convenant à la description de l'aspect et du comportement des poissons	51

Liste des tableaux

- 1 Liste de contrôle des conditions et méthodes recommandées pour la détention et l'acclimatation de la truite arc-en-ciel 6
- 2 Liste de contrôle des conditions et méthodes d'essai recommandées 14

Liste des figures

- 1 Schéma de la démarche adoptée pour définir les conditions et méthodes d'essai adaptées à différents types de substances 2
- 2 Estimation d'une concentration létale 50 par la représentation graphique des mortalités sur papier de probabilité logarithmique 23

Liste des abréviations

°C	degré Celsius
CaCO ₃	carbonate de calcium
CaSO ₄	sulfate de calcium
CL50	concentration létale 50
d	jour
EIT	Évaluation d'identification de la toxicité
g	gramme
h	heure
HCl	acide chlorhydrique
H ₂ O	eau
KCl	chlorure de potassium
L	litre
MC	marque de commerce
mg	milligramme
MgSO ₄	sulfate de magnésium
min	minute
mL	millilitre
N	normal
NaHCO ₃	bicarbonate de sodium
NaOH	hydroxyde de sodium
OD	oxygène dissous (concentration)
SI	Système international d'unités
TL50	temps létal 50
μ	micro
>	supérieur à
<	inférieur à
≥	supérieur ou égal à
≤	inférieur ou égal à

Glossaire

Remarque: Toutes les définitions ci-après s'appliquent aux méthodes énoncées dans le présent rapport; il se peut qu'elles ne soient pas adaptées à d'autres contextes.

Verbes auxiliaires

L'auxiliaire *doit* (*doivent*) est utilisé pour exprimer une obligation absolue.

L'auxiliaire *devrait* (*devraient*) et le mode conditionnel (*il faudrait*, etc.) sont utilisés pour indiquer que la condition ou la méthode en cause est recommandée et doit être respectée dans la mesure du possible.

L'auxiliaire *peut* (*peuvent*) indique qu'on est autorisé à faire une chose ou en mesure de la faire.

Termes techniques généraux

Acclimatation - Adaptation physiologique à un niveau précis d'une ou de plusieurs variables environnementales, par exemple la température. Ce terme s'applique généralement à des conditions contrôlées en laboratoire.

Alevin - Poisson éclos récemment, ne pouvant se nourrir seul et dont le sac vitellin est évident (à des fins nutritives). L'alevin est souvent appelé «larve vésiculée».

Alevin au stade de l'alimentation active - Jeune poisson ayant dépassé le stade larvaire et ayant commencé à se nourrir seul activement.

Conductivité - Expression numérique de la capacité d'une solution aqueuse de transporter un courant électrique. Cette capacité dépend des concentrations des ions en solution, de leur valence et de leur mobilité, ainsi que de la température de la solution. La conductivité s'exprime normalement en millisiemens par mètre (unité SI), ou en $\mu\text{mho/cm}$ ($1 \text{ mS/m} = 10 \mu\text{mhos/cm}$).

Conformité - Fait de respecter les exigences du gouvernement en matière de réglementation ou de délivrance de permis.

Dispersant - Substance chimique qui réduit la tension superficielle entre l'eau et une substance hydrophobe (p. ex., du pétrole), ce qui facilite la dispersion de cette substance dans l'eau sous forme d'émulsion.

Dureté - Concentration, dans l'eau, de cations réagissant avec une solution savonneuse de sodium pour entraîner la précipitation d'un résidu insoluble. En règle générale, la dureté permet de mesurer la concentration d'ions de calcium et de magnésium dans l'eau et s'exprime en mg/L de carbonate de calcium ou l'équivalent.

Émulsifiant - Substance chimique qui facilite le mélange fin (sous forme de minuscules gouttelettes),

dans l'eau, d'une substance normalement hydrophobe).

Fingerling - Jeune poisson de moins d'un an se nourrissant seul.

Floculation - Formation d'un précipité léger en suspension (floc) dans une solution.

Longueur à la fourche - Longueur du poisson, du museau (gueule fermée) jusqu'à la fourche de la queue.

Lux - Unité SI d'éclairement, mesurant l'intensité lumineuse par mètre carré. 1 lux = 0,0929 pied-bougie; 1 pied-bougie = 10,76 lux.

pH - Logarithme négatif de l'activité des ions d'hydrogène, mesurée par leur concentration en équivalents grammes par litre. Cette valeur exprime le degré ou l'intensité des réactions acides et alcalines selon une échelle de 0 à 14, où le nombre 7 représente la neutralité et les nombres inférieurs correspondent, en ordre décroissant, à des réactions acides de plus en plus fortes. Les chiffres supérieurs indiquent, en ordre croissant, des réactions basiques ou alcalines de plus en plus fortes.

Photopériode - Durée d'éclairement et d'obscurité au cours d'un cycle de 24 h.

Pourcentage (%) - Concentration exprimée en parties par centaines. Un pour cent représente une unité ou partie de substance (p. ex., effluent, éluviat, lixiviat ou milieu récepteur) diluée dans l'eau, jusqu'à concurrence de 100 parties. On peut préparer des concentrations en masse par unité de masse ou en volume par unité de volume; on les exprime en pourcentage de la substance en cause dans la solution définitive.

Précipitation - Formation d'un solide (précipité) à partir d'une solution.

Prétraitement - Dans le présent rapport, traitement d'un échantillon ou de sa dilution avant l'exposition des poissons.

Salinité - Quantité totale, en grammes, de solides dissous dans 1 kg d'eau de mer. Elle se détermine après conversion de tous les carbonates en oxydes, après remplacement de tous les bromures et iodures par des chlorures et après oxydation de toute la matière organique. La salinité peut aussi se mesurer directement grâce à un salinimètre/conductimètre ou par d'autres moyens (APHA *et al.*, 1989). Elle s'exprime habituellement en parties par millier (‰).

Surfactant - Substance chimique active en surface (p. ex., un détergent) qui, ajoutée à un liquide non aqueux, en diminue la tension superficielle et facilite la dispersion des matières dans l'eau.

Surveillance - Activités de vérification de la qualité ou de collecte et de communication de données, effectuées de façon régulière (p. ex., quotidienne, hebdomadaire, mensuelle ou trimestrielle). Dans le contexte du présent rapport, ce terme s'applique à la vérification et à la mesure périodique (régulières) de certaines variables biologiques ou de la qualité de l'eau, ainsi qu'au prélèvement et à l'essai d'échantillons d'effluents, d'éluviats, de lixiviat ou de milieux récepteurs pour la mesure de leur toxicité.

Turbidité - Degré de réduction de la clarté de l'eau par la présence de matières en suspension ou autres qui entraînent la diffusion et l'absorption de la lumière, plutôt que sa transmission en ligne droite dans l'échantillon. La turbidité s'exprime généralement en unités de turbidité néphélométrique.

Termes désignant les substances d'essais

Contrôle - Traitement reproduisant l'ensemble des conditions et facteurs qui pourraient influencer les résultats d'une enquête ou d'une étude, à l'exception de la condition particulière faisant l'objet de cette étude. Dans un essai de toxicité aquatique, le contrôle doit reproduire toutes les conditions du ou des traitements d'exposition, mais ne pas renfermer la substance à expérimenter. Le contrôle est utilisé pour établir l'absence de toxicité mesurable en raison de conditions de base de l'essai (p. ex., qualité de l'eau de contrôle/de dilution, état de santé ou la manipulation des organismes soumis à l'essai).

Eau d'amont - Eau de surface (p. ex., dans un cours d'eau ou un lac) qui n'est pas soumise à l'influence de la substance à expérimenter, du fait qu'elle se trouve contre le courant ou assez loin perpendiculairement à celui-ci.

Eau de contrôle/de dilution - Eau utilisée pour le contrôle, pour diluer la substance à expérimenter ou à l'une et l'autre de ces fins.

Eau de dilution - Eau utilisée pour diluer la substance à expérimenter afin d'en préparer différentes concentrations pour les divers traitements des essais de toxicité.

Eau déchlorée - Eau chlorée (généralement, eau potable municipale) qu'on a traitée afin d'en éliminer le chlore et ses composés en solution.

Eau désionisée - Eau qu'on a fait passer à travers des colonnes de résine afin d'en extraire les ions et de la purifier.

Eau distillée - Eau qu'on fait passer à travers un appareil de distillation (au verre borosilicaté ou autre) afin d'en éliminer les impuretés.

Eau reconstituée - Eau désionisée ou distillée au verre à laquelle des produits chimiques réactifs ont été ajoutés. L'eau douce synthétique qui en résulte est exempte de contaminants et possède le pH et la dureté souhaités.

Effluent - Tout déchet liquide (industriel ou urbain) rejeté dans l'environnement aquatique.

Élutriat - Solution aqueuse obtenue après avoir ajouté de l'eau à un déchet solide (p. ex., stériles ou boues de forage ou de dragage), avoir agité le mélange, puis l'avoir centrifugé ou filtré ou avoir décanté le surnageant.

Lixiviat - Eau ou eau usée ayant traversé une colonne de sols ou de déchets solides dans l'environnement.

Milieu récepteur - Eau de surface (p. ex., dans un cours d'eau) où des déchets ont été, ou sont sur le point d'être, déversés (p. ex., immédiatement en amont du point de rejet). D'autres termes doivent être employés afin de préciser le sens de ce terme dans son contexte.

Produit chimique - Dans ce rapport, se dit de tout élément, composé, formule ou mélange de substances chimiques qui peut se retrouver dans l'environnement aquatique par déversement, application ou rejet. Les insecticides, les herbicides, les fongicides, et les larvicides employés contre la lamproie marine et les agents de traitement des déversements de pétrole sont des produits chimiques qui se retrouvent dans l'environnement.

Produit toxique de référence - Produit chimique étalon utilisé pour évaluer la sensibilité des organismes soumis à l'essai afin d'établir les limites de confiance des données de toxicité recueillies sur une substance à expérimenter. Dans la plupart des cas, on exécute un essai de toxicité sur un produit toxique de référence afin d'évaluer la sensibilité des organismes au moment de l'étude d'une substance à expérimenter, ainsi que la précision des résultats obtenus par le laboratoire.

Termes de toxicologie

CL50 - Concentration létale 50, soit la concentration dans l'eau d'une substance qui est censée être létale pour 50 % des organismes soumis à l'essai. La CL50 et ses limites de confiance à 95 % s'obtiennent généralement par analyse statistique des mortalités dans plusieurs concentrations d'essai, après une durée fixe d'exposition. La durée d'exposition doit être précisée (p. ex., CL50 après 96 h).

Essai à renouvellement continu - Essai toxicité pendant lequel les solutions des réservoirs d'essai sont renouvelées en continu par l'apport constant d'une solution fraîche ou par un apport intermittent fréquent.

Essai à renouvellement périodique - Essai de toxicité pendant lequel les solutions d'essai sont renouvelées périodiquement, généralement aux 24 heures. *Syn.* renouvellement, semi-statique, à renouvellement séquentiel.

Essai de toxicité - Détermination de l'effet d'une substance sur un groupe d'organismes sélectionnés, dans des conditions définies. Un essai de toxicité aquatique permet généralement de mesurer dans quelle proportion les organismes sont affectés par une exposition à des concentrations particulières de produits chimiques, d'effluents, d'élutriats, de lixiviats ou de milieux récepteurs.

Essai statique - Essai de toxicité pendant lequel les solutions d'essai ne sont pas renouvelées.

Évaluation d'identification de la toxicité - Prétraitement systématique d'un échantillon (p. ex., correction du pH, filtration, aération), suivi d'essais de toxicité aiguë. Cette évaluation permet de définir le ou les agents qui sont les principaux responsables de la toxicité aiguë dans un mélange complexe.

Évident - Clairement discernable dans les conditions d'essai utilisées.

Létal - Qui entraîne la mort par action directe. Dans le cas d'un poisson, on entend par «mort» la cessation de tous les signes visibles de mouvement ou d'activité.

Résultat - Variable (p. ex., le délai, la réaction des organismes soumis à l'essai) indiquant la fin d'un essai; mesure ou valeur dérivée caractérisant le résultat de l'essai (CL50, TL50, etc.).

Sublétal - Nocif pour les poissons, mais en deçà du niveau qui entraîne directement la mort pendant la durée de l'essai.

TL50 - Temps létal 50, soit la durée d'exposition qui est censée entraîner 50 % de mortalité au sein d'un groupe de poissons détenus dans une solution d'essai particulière.

Toxicité - Capacité propre d'une substance de provoquer des effets nocifs chez les poissons.

Toxicité aiguë - Effet nocif discernable (létal ou sublétal) provoqué chez les organismes soumis à l'essai dans une période d'exposition courte, généralement quatre jours ou moins dans le cas des poissons.

Remerciements

Le présent document a été rédigé en collaboration par M. Don McLeay (McLeay Associates Ltd., West Vancouver, C.-B.) et M. John Sprague (J.B. Sprague Associates Ltd., Guelph, Ontario).

M. G. Sergy et M. R. Scroggins (Protection de l'environnement (PE), Environnement Canada) ont fait fonction de responsables scientifiques officiels et ont apporté leur collaboration et leurs conseils techniques pendant la durée des travaux.

Les membres du Groupe intergouvernemental sur la toxicité aquatique (annexe A) ont participé activement à l'élaboration et à l'examen du document et méritent tous nos remerciements. Nous tenons à souligner en particulier l'apport technique des membres du sous-comité du Groupe intergouvernemental sur la toxicité aquatique composé de: K. Doe, D. MacGregor, R. Parker, R. Scroggins, G. Sergy, R. Watts et G. Westlake) qui a assumé la responsabilité de la première et de la dernière révisions. Nous tenons également à remercier l'équipe des laboratoires d'essai d'Environnement Canada (annexe A). Nous aimerions aussi souligner les observations formulées sur une première version par des scientifiques de L'Institut des eaux douces du ministère des Pêches et Océans (MPO) à Winnipeg (Manitoba) : G. Rawn, B. Holden, et S. Harrison, ainsi que par J. Somers et P. MacQuarrie, membres du Groupe intergouvernemental sur la toxicité aquatique, et M. Taylor, ancien membre du Groupe intergouvernemental sur la toxicité aquatique.

Les personnes suivantes, qui ont passé en revue la version définitive, ont apporté des observations et des conseils à la fois nombreux et utiles : D. Vaughan (PE, Dartmouth, N.-É.), B. Moores (PE, St. John's T.-N.), D. Moul (PE, North Vancouver, C.-B.), S. Yee (PE, North Vancouver, C.-B.), V. Zitko (MPO, St. Andrews, N.-B.), B. Hobden (MPO, Winnipeg, Man.), D. Whittle (MPO, Burlington, Ont.), J. Servizi (MPO, Culus Lake, C.-B.), M. Nassichuk (MPO, Vancouver, C.-B.), I. Birtwell (MPO, West Vancouver, C.-B.), D. Poirier (ministère de l'Environnement de l'Ontario, Rexdale, Ont.), J. Lee (ministère de l'Environnement de l'Ontario, Rexdale, Ont.), S. Horvath (ministère de l'Environnement de la Colombie-Britannique, Vancouver C.-B.), G. van Aggelen (ministère de l'Environnement de la Colombie-Britannique, North Vancouver, C.-B.), T. Kovacs (Institut canadien de recherches sur les pâtes et papiers, Pointe-Claire, Québec), L. Callow (Ressources de Gulf Canada Ltée, Calgary, Alberta), G. Craig (Beak Consultants Ltd., Brampton, Ont.), R. Evers (BAR Environmental, Guelph, Ont.), P. Chapman (EVS Consultants Ltd., North Vancouver, C.-B.), et D. Montieth (B.C. Research Corp., Vancouver, C.-B.).

Introduction

1.1 Contexte

On ne peut s'attendre à ce qu'un seul organisme ou une seule méthode d'essai répondent aux besoins d'une démarche globale en matière de conservation et de protection de l'environnement. Pour mettre en oeuvre les mesures préventives et correctives nécessaires afin de gérer l'environnement, il faut pouvoir faire appel à une batterie d'essais de toxicité aquatique bien définis et triés sur le volet. Sergy (1987), en collaboration avec le Groupe intergouvernemental sur la toxicité aquatique (consulter la liste des membres à l'annexe A), a proposé une série d'essais qui seraient généralement acceptables et qui permettraient de mesurer différents types d'effets toxiques chez divers organismes. L'essai de létalité aiguë sur la truite arc-en-ciel est l'un des essais de toxicité aquatique «de base» qu'on a choisi de normaliser de sorte qu'il permette de respecter les exigences d'Environnement Canada en matière d'essais.

Le présent rapport décrit les méthodes universelles qui s'appliquent à tout essai de létalité aiguë sur la truite arc-en-ciel exécuté dans des conditions contrôlées en laboratoire. Il présente également des ensembles particuliers de conditions d'essai et de méthodes, prescrits ou recommandés lorsqu'on utilise des essais de létalité aiguë pour l'évaluation de différents types de substances (à savoir des échantillons de produits chimiques, d'effluents, d'éluviats, de lixiviats ou de milieux récepteurs) (figure 1). Les méthodes et conditions particulières applicables à la conduite de l'essai et à sa normalisation sont définies et, au besoin, élaborées dans des notes en bas de page. En mettant au point ces méthodes, on s'est efforcé de mettre en balance des considérations scientifiques, pratiques et financières, en plus de veiller à ce que les

résultats soient assez exacts et précis pour la majorité des cas d'application des méthodes.

Les auteurs ont supposé que le lecteur connaît déjà, dans une certaine mesure, les essais de toxicité aquatique. Le présent document ne renferme pas d'instructions explicites sur tous les détails, comme celles qui peuvent s'avérer nécessaires dans un protocole réglementaire particulier; néanmoins, il est destiné à servir de guide pour cette application et d'autres utilisations.

1.2 Répartition de l'espèce et utilisation antérieure pour des essais

La truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*, auparavant *Salmo gairdneri**) provient de l'ouest de l'Amérique du Nord, essentiellement de l'ouest des Rocheuses; cependant, cette espèce (qui comprend la truite anadrome et la truite Kamloops) fréquente désormais les eaux de toutes les provinces canadiennes, à la suite d'introductions tant intentionnelles que non délibérées. Ce poisson prospère dans la plupart des eaux froides et douces (lacs, ruisseaux et cours d'eau). Il existe en outre dans les deux régions côtières du pays des sous-espèces de truite arc-en-ciel (p. ex., la truite anadrome) qui vivent dans la mer et regagnent les cours d'eau pour le frai (Scott et Crossman, 1973). La truite arc-en-ciel a été introduite dans le monde entier avec beaucoup de succès et est sans doute aujourd'hui l'espèce de salmonidés la plus répandue. Au Canada et dans d'autres pays, elle est élevée dans de très nombreuses écloseries pour êtreensemencée dans les eaux naturelles aux fins de la pêche sportive; elle est aussi l'une

* Les taxonomistes de l'Amérique du Nord ont récemment renommé cette espèce.

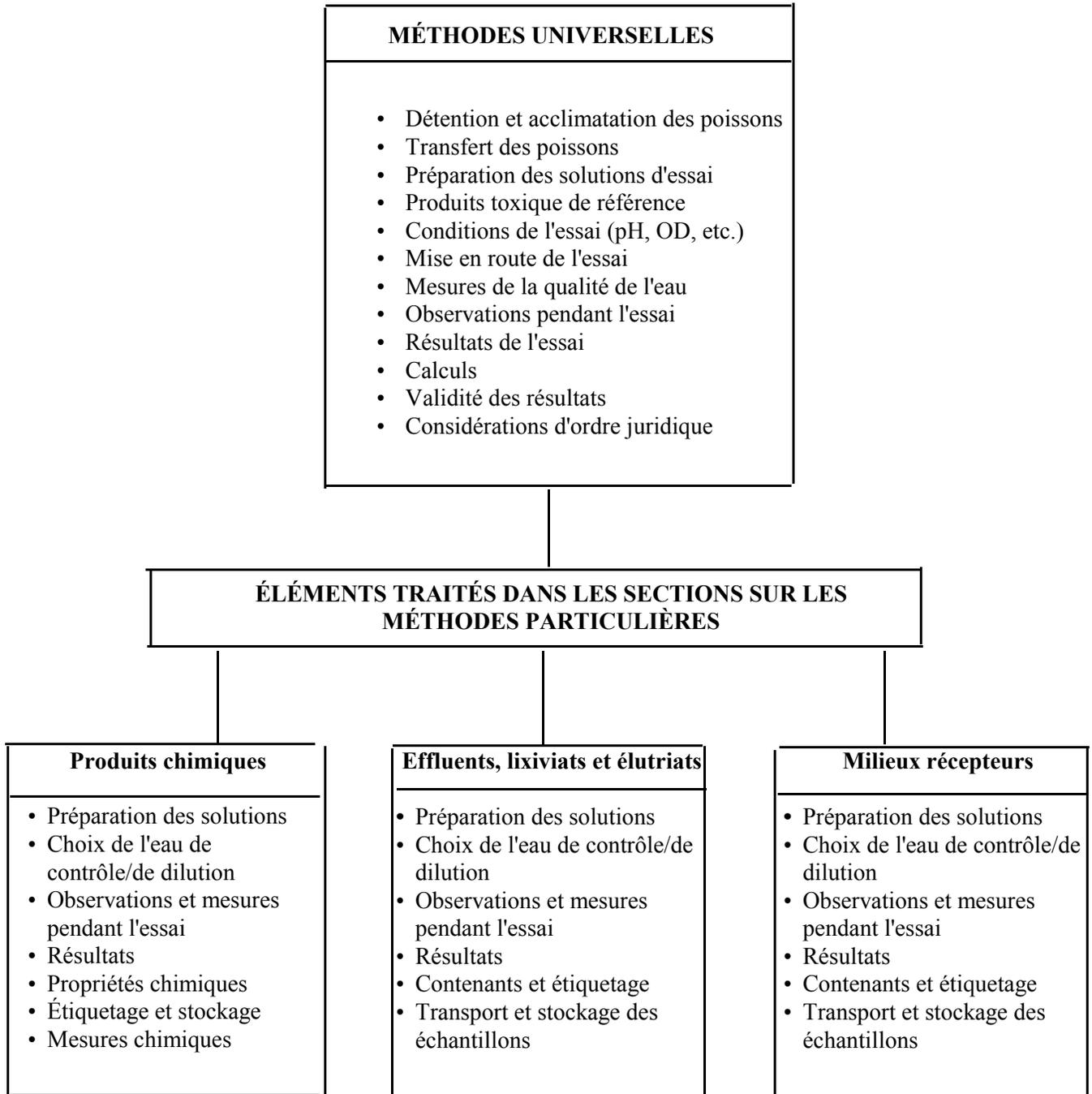


Figure 1 Schéma de la démarche adoptée pour définir les conditions et méthodes d'essai adaptées à différents types de substances

des espèces les plus couramment utilisées dans l'aquiculture commerciale.

La truite arc-en-ciel est également devenue, dans le monde entier, le poisson d'eau froide étalon pour les études sur la pollution des eaux douces et la recherche en toxicologie aquatique. Son élevage est bien implanté, et de nombreuses écloseries fournissent des oeufs ou de jeunes poissons adaptés aux besoins des essais de toxicité. Une banque de données toxicologiques d'une ampleur appréciable a été constituée pour cette espèce. L'utilisation courante et répandue de la truite arc-en-ciel dans les laboratoires d'Environnement Canada (annexe A) et dans d'autres laboratoires partout au pays a permis la réalisation d'études diverses : comparaisons de la toxicité de différents effluents et produits chimiques; comparaisons, dans le temps, pour un secteur industriel ou un emplacement donné; et évaluations de composés toxiques dans un déchet complexe. Le corpus de données toxicologiques sur cette espèce, sa sensibilité éprouvée aux contaminants aquatiques, son importance commerciale et sa grande disponibilité font d'elle un choix logique pour des essais de toxicité normalisés en eau douce et froide.

Depuis deux décennies, la truite arc-en-ciel est couramment utilisée, au Canada, pour l'évaluation des effets toxiques aigus (à court terme) sur les salmonidés (et, par extension, sur d'autres organismes aquatiques sensibles) découlant de l'exposition réelle ou potentielle à des produits chimiques ou à des effluents (Sprague, 1969; Pessah et Cronwall, 1980; Wells et Moyses, 1981; Dafoe *et al.*, 1984). Environnement Canada a promulgué, au cours des années 1970 (SPE, 1971, 1974, 1977 a-c), une série de règlements et de directives canadiens pour la réalisation d'essais de létalité aiguë de certains types d'effluents aqueux sur la truite arc-en-ciel. Une méthode normalisée pour l'essai d'effluents aqueux avec la truite arc-en-ciel a été publiée en 1980 (SPE, 1980). Les directives d'Environnement Canada sur l'utilisation de

dispersants pour lutter contre les déversements de pétrole prévoient également de méthodes d'essai faisant appel à la truite arc-en-ciel (SPE, 1973, 1984). Certaines provinces ont mis au point des directives et des méthodes de laboratoire pour mesurer la toxicité létale aiguë d'effluents liquides chez la truite arc-en-ciel (Rocchini *et al.*, 1982; McGuinness, 1982; Craig *et al.*, 1983; Ontario, 1989).

Les méthodes d'essai exposées en détail dans ces ouvrages et d'autres documents officiels prévoient des résultats différents; certaines ne traitent pas de questions aussi importantes que la correction du pH, les écarts de méthodologie liés aux différents objectifs des essais, les critères admissibles pour le choix et la préparation de l'eau de contrôle/de dilution, ou la façon de traiter les échantillons qui renferment des quantités appréciables de solides ou de matières flottantes. La plupart des rapports de méthodologie actuels relatifs aux essais de létalité aiguë sur la truite arc-en-ciel énoncent les modalités d'exécution d'essais portant sur des effluents ou des produits chimiques, sans toutefois fournir de lignes directrices sur les essais concernant des éluviats, des lixiviats ou des milieux récepteurs. En outre, ils omettent souvent d'expliquer le choix de certaines conditions ou démarches particulières. L'annexe B donne un aperçu des variables méthodologiques et des méthodes exposées dans les rapports de méthodologie actuels.

Les questions dont nous venons de traiter ont été prises en considération dans l'élaboration du présent rapport. La méthodologie qu'il expose est conçue pour des truites arc-en-ciel acclimatées en eau douce et pour des solutions d'essai essentiellement constituées d'eau douce (c.-à-d., dont la salinité est inférieure ou égale à 10 ‰) ou constituées d'eau salée mais devant ensuite être rejetées dans des eaux douces; elle fait en outre appel à de l'eau douce comme eau de contrôle/de dilution. On peut l'utiliser dans d'autres contextes mais, dans certains cas,

l'incidence réelle ou potentielle de substances données sur l'environnement d'eau douce est encore à l'étude. Il est possible d'utiliser d'autres essais, sur des espèces acclimatées à l'eau de mer, pour évaluer l'incidence réelle ou potentielle de

substances dans les environnements estuariens ou marins, ou encore pour évaluer des solutions d'essai d'une salinité supérieure à 10 ‰ qui doivent être rejetées dans de tels environnements.

Organismes soumis à l'essai

2.1 Espèce

La truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) doit être utilisée pour les essais.

2.2 Cycle biologique et taille

On peut utiliser des alevins au stade de l'alimentation active ou des fingerlings. Le poids frais moyen des poissons devrait être compris entre 0,3^a et 2,5 g. Le plus gros poisson ne devrait pas être plus de deux fois plus long que le plus petit poisson soumis au même essai. Afin d'assurer un taux de chargement adéquat et l'uniformité de la taille des poissons soumis à l'essai, on devrait mesurer régulièrement la longueur à la fourche et le poids frais moyens (\pm l'écart type) d'un échantillon représentatif de poissons (p. ex., mesurer chaque semaine au moins 10 poissons prélevé dans le réservoir de détention, ou mesurer les poissons témoins à la fin de l'essai).

2.3 Source

On peut se procurer les poissons aux stades de l'oeuf embryonné, de l'alimentation active ou de fingerling. Tous les poissons utilisés dans un essai devraient provenir de la même population et de la même source. Ils doivent être exempts de maladies connues (Roberts et Shepherd, 1986) et provenir d'une écloserie. L'obtention et l'expédition des poissons devraient être approuvées par des représentants régionaux du

^a En certaines circonstances (p. ex., dans un but de recherche), les très jeunes alevins dont le poids moyen est inférieur à 0,3 g pourraient être utilisés pour les essais de toxicité, à condition qu'ils se nourrissent activement depuis au moins deux semaines et qu'ils ont été acclimatés pendant cette période aux conditions d'éclairage et de température prévues pour l'essai.

comité fédéral-provincial de transplantations d'espèces de Pêches et Océans (MPO), dans les provinces où ce comité contrôle les mouvements des stocks de poissons. Pour obtenir des renseignements sur les représentants du comité des transplantations d'espèces sur les sources de truites arc-en-ciel adaptées à la réalisation d'essais de toxicité aquatique, on peut communiquer avec les bureaux régionaux de la Protection de l'environnement (annexe A).

2.4 Détention et acclimatation

Le tableau 1 fournit une liste de contrôle sommaire des conditions recommandées pour la détention et l'acclimatation de la truite arc-en-ciel.

2.4.1 Installations

Les oeufs et les alevins peuvent être incubés dans des plateaux d'alevinage à débit vertical ou dans des bassins à écoulement d'eau fabriqués de matériaux non toxiques comme l'acier inoxydable, la porcelaine, le polyester armé de fibre de verre, l'acrylique, le polyéthylène ou le polypropylène. Les méthodes de détention et d'incubation des oeufs et des alevins devraient être conformes aux pratiques normales des écloséries (Leitritz et Lewis, 1976).

Les alevins et les fingerlings peuvent être élevés et acclimatés dans des bassins ou des réservoirs où l'eau peut s'écouler. Ces bassins ou réservoirs doivent également être fabriqués de matériaux non toxiques (voir la liste ci-dessus). Ils devraient être à l'abri de toute agitation et se trouver, de préférence, dans un endroit séparé des réservoirs d'essai.

Les bassins ou réservoirs de détention (ou d'élevage) peuvent être à l'intérieur ou en plein

Tableau 1 Liste de contrôle des conditions et méthodes recommandées pour la détention et l'acclimatation de la truite arc-en-ciel

Source de poissons	Poissons obtenus d'une éclosérie et exempts de maladies connues. Obtention approuvée par le comité fédéral-provincial des transplantations d'espèces (MPO), dans les provinces où ce comité est actif.
Eau	Approvisionnement non contaminé d'eau des surface, d'eau souterraine ou d'eau municipale déchlorée. Volume et débit pour la détention : 1,0 L/10 g de poissons et 1,4 L/g de poissons par jour respectivement.
Température	Température de détention variant de 4 à 18 °C. Température d'acclimatation obtenue à raison d'au plus 3 °C/d et maintenue à 15 ± 2 °C pendant au moins deux semaines.
Oxygénation/aération	Oxygène dissous de 80 à 100 % de saturation, maintenu au besoin par aération avec de l'air filtré exempt d'huile.
pH	Entre 6,0 et 8,5.
Qualité de l'eau	La température, l'oxygène dissous, le pH et le débit doivent être surveillés dans chaque réservoir de détention ou d'acclimatation, de préférence chaque jour.
Éclairage	Éclairage fluorescent à spectre continu, entre 100 à 500 lux à la surface; lumière pendant 16 ± 1 h, obscurité pendant 8 ± 1 h, avec transition progressive de préférence.
Alimentation	Au moins une fois par jour, avec des aliments commerciaux standard en boulettes. Débit quotidien d'alimentation : de 1 à 5 % du poids frais (selon la taille des poissons, la température de l'eau et les recommandations du fabricant). Le type de ration, la taille de boulettes, la fréquence de l'alimentation et les conditions de stockage de la nourriture doivent être confirmés aux recommandations du fabricant.
Nettoyage	Siphonnage des débris tous les jours ou selon les besoins; transfert dans des réservoirs propres et désinfectés, si nécessaire.
Maladie	Les mortalités doivent être surveillées chaque jour, les poissons moribonds étant enlevés. Le taux de mortalité du groupe de poissons devant être soumis à l'essai doit être inférieur à 2 % pendant les sept jours précédant l'essai. Si les poissons sont traités pour une maladie, on ne doit pas les utiliser dans les deux semaines qui suivent.

air. Les réservoirs servant pour l'acclimatation des poissons à éclairage en laboratoire et aux autres conditions de l'essai devraient se trouver à l'intérieur; s'ils sont en plein air, on devrait les doter de couvercles munis d'appareils d'éclairage à réglage de la photopériode.

2.4.2 Éclairage

Selon les exigences et l'objet de l'essai, l'éclairage pendant l'acclimatation peut être naturel ou assuré par des appareils fluorescents suspendus à spectre continu^b. Si un réglage photopériodique est nécessaire, la photopériode devrait normalement correspondre à une séquence constante de 16 ± 1 h de lumière et 8 ± 1 h d'obscurité. L'éclairage à la surface devrait être entre 100 et 500 lux. Une période de transition de 15 à 30 minutes entre la lumière et l'obscurité est recommandée pour l'éclairage artificiel^c. Les poissons devraient être acclimatés

^b Des fluorescents ou autres tubes à spectre continu, complétés au besoin d'un éclairage naturel extérieur, devraient être utilisés pour reproduire la portion visible du spectre électromagnétique. À noter cependant que l'intensité de la radiation ultraviolette (U.V.-B) obtenue avec un éclairage fluorescent blanc froid ou des fluorescents à spectre continu ne se rapproche pas de celle obtenue avec un éclairage naturel, et que la toxicité de certains effluents et produits chimiques peut être fortement altérée par des réactions photolytiques causées par les rayons U.V.-B. Pour certains essais (p. ex., photo-activation ou photodégradation de matières toxiques par les rayons U.V.), des éclairages spéciaux (p. ex., lampes à vapeur de mercure à haute pression) dotés de caractéristiques spectrales différentes peuvent convenir. Des informations utiles sont données à ce sujet dans la publication de l'ASTM (1995). Les études visant à déterminer l'influence de l'éclairage sur la toxicité pourraient comprendre des comparaisons juxtaposées avec des répliqués de solutions exposées à des conditions d'éclairage différentes (p. ex., éclairage fluorescent blanc froid *versus* lampe à vapeur de mercure haute pression).

^c Une période de transition («aube et crépuscule») est recommandée, étant donné que des changements brusques d'intensité ont pour effet d'effrayer et de stresser les poissons. Il existe des systèmes de rhéostats automatisés pour diminuer et accentuer l'intensité de l'éclairage fluorescent; ces systèmes sont cependant coûteux. On peut

à des conditions d'éclairage (y compris la photopériode et l'intensité lumineuse) conformes aux conditions de l'essai pour une durée d'au moins deux semaines et, de préférence, de trois semaines ou plus avant l'essai.

2.4.3 Eau

Pour la détention et l'acclimatation des poissons, on peut utiliser un approvisionnement non contaminé d'eau souterraine, d'eau de surface ou d'eau potable municipale déchlorée. On devrait au préalable avoir démontré que cette eau favorise de façon constante et fiable la survie, la santé et le développement de la truite arc-en-ciel. Afin de documenter la qualité de l'eau, on devrait effectuer, aussi souvent que nécessaire, des contrôles et des évaluations des variables comme le chlore résiduel, le fluor, le pH, la dureté, l'alcalinité, le carbone organique total, la conductivité, les solides en suspension, l'oxygène dissous, les gaz totaux dissous, la température, l'azote ammoniacal, les nitrites, les métaux et l'ensemble des pesticides organophosphorés.

S'il faut utiliser de l'eau potable municipale pour l'élevage des poissons et comme eau de contrôle/de dilution, on doit assurer une déchloration efficace de l'eau à laquelle les poissons sont exposés, de sorte qu'elle soit exempte de toute concentration nocive de chlore. La teneur en chlore résiduel total de l'eau dans les bassins d'élevage et de l'eau de contrôle/de dilution dans les réservoirs d'essai ne devrait pas dépasser 0,002 mg/L (CCMRE, 1987).

S'il faut utiliser de l'eau reconstituée comme eau de contrôles/de dilution (section 5.3), les

également utiliser une source secondaire d'éclairage incandescent, réglée par minuterie et rhéostat automatisé, afin d'assurer cette période de transition.

poissons doivent être acclimaté à cette eau pendant au moins cinq jours avant l'essai^d.

On peut aussi utiliser à cette fin une eau naturelle dont la dureté se situe à $\pm 20\%$ de celle de l'eau reconstituée, ou encore une eau naturelle corrigée pour obtenir cette dureté avec de l'eau désionisée (si elle est trop dure) ou avec une quantité et une proportion appropriée (p. ex., ASTM, 1980) de sels de qualité «réactif» (si elle est trop douce).

Il est nécessaire d'assurer un débit d'eau constant dans les réservoirs de détention et d'acclimatation. Pour empêcher l'accumulation de déchets métaboliques, on devrait admettre dans le réservoir au moins 1 L/min d'eau fraîche par kilogramme de poissons détenus (soit 1,4 L/g · d ou 0,69 g · d/L)^e. De plus, pour éviter le surpeuplement, chaque réservoir devrait renfermer, en tout temps, au moins 1 L d'eau pour chaque tranche de 10 g de poissons détenus (Sprague, 1973). Des circonstances exceptionnelles, par exemple l'acclimatation des poissons à l'eau reconstituée, peuvent nécessiter la filtration et la recirculation de l'eau, ou encore son renouvellement périodique dans des systèmes statiques. En pareil cas, il faudrait mesurer fréquemment l'ammoniac et les nitrites afin d'assurer qu'ils n'atteignent pas de niveaux nocifs. Des nombres-guides ont été établis pour la

^d Sans cette acclimatation, on peut perdre l'avantage que présente une eau de dilution normalisée. Ainsi, il faut compter plusieurs jours pour permettre aux poissons de réadapter leur tolérance aux métaux lourds quand ils sont placés dans une eau à teneur minérale différente (Lloyd, 1965).

^e Au besoin (par exemple, si les poissons doivent être acclimatés à de l'eau reconstituée, à un milieu récepteur ou à une eau d'une source dont la quantité est restreinte), on peut réduire considérablement les besoins d'eau pour leur acclimatation en faisant recirculer l'eau dans le réservoir après l'avoir fait passer par un filtre adapté à l'élimination des déchets métaboliques. Si l'on procède ainsi, il faudrait surveiller les concentrations d'ammoniac et de nitrites dans le réservoir d'acclimatation et les maintenir en deçà des niveaux nuisibles pour la santé des poissons.

protection de la vie en eau douce; il s'agit de concentrations maximales de 0,02 mg/L d'ammoniac non ionisé (Ontario, 1984) et de 0,06 mg/L de nitrites (CCMRE, 1987).

L'eau qui entre dans les réservoirs de détention et d'acclimatation ne doit pas être sursaturée en gaz. Si on a lieu de croire qu'il peut y avoir sursaturation, on devrait vérifier fréquemment la pression de gaz totale de l'alimentation en eau (Bouck, 1982). On doit recourir à des mesures correctives (p. ex., l'utilisation de colonnes d'aération ou une aération vigoureuse dans un réservoir ouvert) si la saturation en gaz dissous dépasse 100 %.

On devrait contrôler régulièrement, de préférence tous les jours, la température de l'eau de chaque bassin d'acclimatation ou de détention ainsi que sa teneur en oxygène dissous, son pH et son débit. Il est aussi recommandé de contrôler chaque semaine, ou plus fréquemment, la teneur de l'eau en ammoniac, en nitrites et en chlore résiduel total (si l'eau est fournie par une municipalité).

2.4.4 Température

La température de l'eau pour la détention de populations de poissons en vue d'essais ultérieurs peut se situer en dehors des limites admissibles pour l'essai, à condition d'être compatible avec la santé des poissons (soit de 4 à 18° C). Lorsqu'on prépare un lot de poissons pour la période d'acclimatation, on peut modifier la température de l'eau à raison d'au plus 3° C/d jusqu'à ce que la température d'acclimatation de $15 \pm 2^\circ$ C soit atteinte. Les poissons doivent être acclimatés à cette température pendant au moins deux semaines, de préférence, pendant trois semaines ou plus avant le début de l'essai.

2.4.5 Oxygène dissous

La teneur en oxygène dissous (OD) de l'eau des réservoirs de détention et d'acclimatation devrait correspondre à 80 à 100 % de saturation en air. S'il est nécessaire de maintenir ce niveau d'OD, on devrait assurer une aération complémentaire

des réservoirs au moyen d'air comprimé filtré et exempt d'huile.

2.4.6 pH

Le pH de l'eau utilisée pour la détention et l'acclimatation des poissons devrait être compris entre 6,0 et 8,5. Il est souhaitable d'utiliser une eau dont le pH se situe entre 7,5 et 8,0 (Klontz *et al.*, 1979).

2.4.7 Alimentation

Il faudrait nourrir les poissons avec une nourriture en boulettes commerciale standard reconnue, adaptée à la truite arc-en-ciel. Selon la température de l'eau et leur taille, les poissons devraient être nourris une ou plusieurs fois par jour, la ration quotidienne correspondant normalement à 1 à 5 % du poids corporel frais (annexe C). Le type et la taille des boulettes, la ration et la fréquence de l'alimentation ainsi que la méthode et la durée maximale d'entreposage de la nourriture devraient être choisis en fonction de la taille et de l'âge des poissons, de la température de l'eau et des recommandations du fabricant.

2.4.8 Nettoyage des réservoirs

Les bassins et réservoirs utilisés pour la détention et l'acclimatation de poissons devraient rester propres. Une fois par jour ou aussi souvent que nécessaire, il faudrait siphonner la nourriture excédentaire et les excréments, afin d'éviter qu'ils ne s'y accumulent. Il est recommandé de recourir à l'un des modèles de réservoirs qui assurent un autonettoyage partiel (p. ex., ceux qui sont dotés de colonnes d'alimentation doubles et centrales), puisqu'ils permettent de réduire les exigences d'entretien.

Afin de diminuer les chances des maladies, il faudrait désinfecter les réservoirs avant d'y déposer un nouveau lot de poissons. Les désinfectants appropriés comprennent ceux qui renferment des composés chlorés ou iodophores, ou du chlorure de n-alkyldiméthylbenzylammonium (p. ex., Comet^{MC},

Ovidine^{MC}, Argentyne^{MC} ou Roccal^{MC}). Étant donné que les désinfectants sont toxiques pour les poissons, les réservoirs devraient ensuite être rincés à fond avec l'eau servant à la détention et à l'acclimatation des poissons.

2.4.9 Morbidité, mortalité et traitement des poissons

Il faudrait inspecter chaque jour les poissons afin de détecter des signes de maladies^f; les renseignements sur leur apparence et leur comportement devraient être consignés. Les individus morts ou moribonds doivent être enlevés immédiatement.

Le taux de mortalité dans les réservoirs où sont gardés les poissons qui serviront aux essais devrait être surveillé et consigné quotidiennement, ou au minimum cinq jours par semaine (p. ex., du lundi au vendredi). Pendant la période de sept jours précédant l'essai, le taux de mortalité doit être inférieur à 2 %. Si ce taux est compris entre 2 et 10 %, la durée d'acclimatation doit être prolongée d'une période additionnelle d'au moins sept jours (soit jusqu'à ce qu'il y ait moins de 2 % de mortalités par tranche de sept jours). Si le taux de mortalité dépasse 10 % par semaine^g pendant la période d'acclimatation, le groupe de poissons est inadmissible pour utilisation ultérieure lorsque les mortalités sont causées par la maladie ou la présence de contaminants aquatiques. Lorsqu'elles sont attribuables à d'autres causes

^f Les symptômes de problèmes de santé chez les poissons comprennent la perte d'appétit, une distribution anormale dans le réservoir, la léthargie, un comportement de nage irrégulier ou atypique, une coloration foncée, des branchies pâles, des nageoires rongées ou effilochées et des lésions externes. La deuxième édition du *Handbook of Trout and Salmon Diseases* (Roberts et Shepherd, 1986) constitue un guide pour le dépistage et le diagnostic préliminaires des maladies chez des salmonidés.

^g Selon les critères de mortalité prescrits par l'Organisation de coopération et de développement économiques (OCDE, 1984).

(p. ex., taux de mortalité initial élevé pendant le passage au stade de l'alimentation active ou à la suite du transfert des poissons), on peut utiliser les poissons pour des essais de toxicité à condition que le taux de mortalité dans les réservoirs d'où ils proviennent baisse à moins de 2 % pendant les sept jours précédant immédiatement l'essai.

Il faudrait éviter, dans la mesure du possible, d'utiliser des produits chimiques pour prévenir ou contrôler les maladies chez les poissons. Il est fortement recommandé de se départir des stocks

de poissons qui présentent des signes de maladie, plutôt que de les traiter. Si l'utilisation de poissons traités avec des produits chimiques ne peut être évitée, un délai d'au moins deux semaines devrait être respecté avant de les utiliser dans des essais. Des dossiers rapportant toute maladie et traitement chimique appliqué à des poissons destinés à des essais devraient être obtenus des piscicultures, et on devrait garder de tels dossiers tout au long de la période de détention et d'acclimatation dans les installations d'essai.

Système d'essai

3.1 Installations

L'essai doit être réalisé dans une installation isolée des allées et venues générales du laboratoire. S'il n'existe pas de pièce isolée, la zone d'essai devrait être entourée d'un rideau opaque (p. ex., en plastique noir), afin de réduire le stress infligé aux poissons pendant l'essai. La poussière et les émanations devraient être réduites au minimum.

Il faut prévoir une installation d'essai permettant de maintenir la température de toutes les solutions d'essai dans l'intervalle précisé ($15 \pm 1^\circ$ C). On peut y arriver par différents moyens, notamment un appareil de conditionnement de l'air réglé par thermostat ou une série de bains-marie à température contrôlée dans lesquels les réservoirs d'essai sont immergés.

3.2 Éclairément

Les conditions d'éclairément auxquelles les poissons sont soumis devraient être identiques à celles définies à la section 2.4.2. La photopériode doit être établie pour coïncider avec celle à laquelle les poissons ont été acclimatés.

3.3 Réservoirs d'essai

Les réservoirs pour l'essai de produits chimiques devraient être en verre^h (bocaux ou aquariums, selon la taille et le nombre de poissons par contenant). Les réservoirs pour l'essai d'échantillons d'effluents, d'élutriats, de lixivats

ou de milieux récepteurs peuvent être en verre, en Plexiglas, en acrylique, en polypropylène ou en polyéthylène, ou être revêtus de polyéthylène. Si des revêtements jetables sont utilisés dans les réservoirs, il n'est pas nécessaire de les rincer avec de l'eau de contrôle/de dilution, mais il ne faut pas les réutiliser.

Tous les réservoirs d'essai devraient contenir au moins 15 cm d'eau. Dans un même essai, la profondeur de l'eau ainsi que le type, la taille et la forme des contenants devraient être identiques pour toutes les solutions.

3.4 Eau de contrôle/de dilution

Selon la substance à expérimenter et l'objet de l'essai (sections 5 à 7), l'eau de contrôle/de dilution peut être : de l'eau souterraine ou de surface (provenant d'un fleuve, d'une rivière ou d'un lac) «non contaminée»; de l'eau municipale déchloréeⁱ (section 2.4.3); de l'eau douce reconstituée au pH et à la dureté souhaitées (de façon à simuler ceux du milieu récepteur); ou un échantillon d'eau du milieu récepteur recueilli en amont ou à proximité de la source de contamination, mais à l'abri de son influence. Les conditions relatives au prélèvement, au transport et au stockage des échantillons de milieux récepteurs devraient être conformes aux dispositions de la section 6.1.

L'eau de contrôle/de dilution doit être amenée à la température de l'essai avant d'être utilisée. La sursaturation en gaz de cette eau doit être évitée (section 2.4.3).

^h Les contenants en verre sont inertes et faciles à nettoyer, et ils permettent d'observer sans obstacle les poissons. L'adsorption sur les contenants qui ne sont pas en verre (p. ex., en polyéthylène, en acier inoxydable) varie considérablement d'un produit chimique à un autre.

ⁱ L'addition de thiosulfate ou d'autres produits chimiques à l'eau de dilution pour enlever le chlore résiduel n'est pas recommandée. Ces produits chimiques pourraient modifier la toxicité de l'échantillon.

Avant son utilisation, l'eau de contrôle/de dilution devrait avoir une teneur en oxygène dissous de 90 à 100 % de la valeur de saturation en air. Au besoin, le volume nécessaire d'eau de contrôle/de dilution devrait être aéré vigoureusement (à l'aide d'un jet d'air comprimé

exempte d'huile passant à travers des pierres de barbotage immédiatement avant l'utilisation; il faudrait alors en vérifier la teneur en oxygène dissous pour confirmer qu'un niveau de 90 à 100 % de saturation a été atteint.

Méthodes d'essai universelles

Les méthodes exposées dans la présente section s'appliquent à l'ensemble des essais d'eaux usées et de produits chimiques visés dans les sections 5, 6 et 7. Tous les aspects du système d'essai défini dans la section précédente doivent y être intégrés.

Le tableau 2 fournit une liste de contrôle récapitulative des conditions et méthodes recommandées pour les essais de toxicité létale aiguë sur la truite arc-en-ciel. On y tient compte des méthodes recommandées pour les essais portant sur des types particuliers de substances.

4.1 Préparation des solutions d'essai

Tous les réservoirs, dispositifs de mesure, appareils d'agitation et seaux pour le transfert des poissons doivent être nettoyés et rincés à fond, conformément aux modes opératoires normalisés. Chaque réservoir d'essai devrait être rincé avec de l'eau de contrôle/ de dilution juste avant son utilisation*.

Les concentrations d'essai et le nombre de solutions à préparer dépendent de l'objet de l'essai. Lorsqu'on veut estimer une CL₅₀ après 96 h, il faut préparer au moins cinq concentrations d'essai et une solution de contrôle (eau de dilution à 100 %) ^j. On peut utiliser une série géométrique de dilutions dans laquelle chaque concentration successive s'établit à environ 50 % de la précédente (p. ex., 100, 50,

* Le rinçage n'est pas nécessaire si l'on utilise un revêtement de polyéthylène jetable.

^j On peut procéder à un essai préalable (de détermination de l'ordre de grandeur) avant d'entreprendre l'essai définitif; cet essai porte généralement sur une gamme de concentrations plus vaste et se déroule fréquemment en 24 h ou moins. Afin d'établir la CL₅₀ finale, chaque essai doit comprendre une ou plusieurs solutions de contrôle.

25, 12,5, 6,3). On peut aussi choisir les concentrations d'essai à partir d'une série logarithmique appropriée de dilutions (annexe D).

Si l'on utilise un milieu récepteur comme eau de contrôle/de dilution, il faudrait préparer une deuxième solution de contrôle en utilisant l'eau du laboratoire à laquelle les poissons ont été acclimatés pendant deux semaines ou plus. On ne peut utiliser de l'eau d'amont si elle est manifestement toxique selon les critères de l'essai auquel elle est destinée^k; en pareil cas, l'eau du laboratoire à laquelle les poissons ont été acclimatés devrait être utilisée comme eau de contrôle et pour l'ensemble des dilutions.

Pour un essai donné, il faut utiliser la même eau de dilution afin de préparer la solution de contrôle et toutes les concentrations d'essai. On doit préparer un volume identique de chaque solution d'essai, laquelle doit être bien mélangée avec une baguette de verre, un agitateur en Téflon^{MC} ou un autre dispositif fait d'un matériau non toxique (p. ex., acier inoxydable).

4.2 Mise en route de l'essai

Chaque réservoir placé dans l'installation d'essai doit porter un code ou une étiquette précisant clairement la substance à expérimenter et sa concentration, ainsi que la date et l'heure du début de l'essai. Les réservoirs devraient être installés de façon à faciliter l'observation du comportement et de la mortalité des poissons.

^k Une comparaison de l'aspect, du comportement et de la survie des poissons dans cette eau de contrôle, par rapport au contrôle du milieu récepteur, permet de distinguer les réactions de toxicité qui peuvent être attribuables à la présence de contaminants dans l'eau d'amont.

Tableau 2 Liste de contrôle des conditions et méthodes d'essai recommandées**Méthodes Universelles**

Type d'essai	Statique, durée de 96 h*
Eau de contrôle/ de dilution	Eau souterraine, eau de surface ou eau municipale déchlorée; milieu récepteur «en amont» pour évaluer les effets toxiques à un endroit précis**; eau reconstituée s'il faut assurer un degré élevé de normalisation; oxygène dissous (OD) de 90 à 100 % de saturation au moment de l'utilisation.
Poisson	Alevin au stade de l'alimentation active ou fingerling; poids moyen de 0,3 à 2,5 g; en principe, au moins 10 poissons par solution d'essai; densité de chargement maximale de 0,5 g/L.
Profondeur de la solution	15 cm au minimum.
Température	15 ± 1°C.
Oxygène/ aération	Au moment de la préparation, préaérer, si requis ou si nécessaire, chaque solution d'essai pendant 30 minutes à raison de 6,5 ± 1 mL/min·L (voir sections 5.2, 6.2 et 7.2); par la suite et seulement si cela est nécessaire, préaérer chaque solution, au même débit, pendant une période additionnelle d'au plus 90 minutes ou, si l'on a obtenu en un temps plus court ≥ 70 % de saturation dans la solution d'essai de la concentration la plus élevée, au temps voulu pour y parvenir. Aérer les solutions à ce débit pendant l'essai.
pH	Aucune correction si le pH de la solution d'essai est compris entre 5,5 et 8,5***; un deuxième essai (à pH corrigé) peut s'avérer nécessaire ou pertinent si le pH de l'échantillon ou de la solution n'est pas compris dans cet intervalle.
Éclairage	Fluorescent à spectre continu; entre 100 et 500 lux à la surface; normalement, 16 ± 1 h de lumière et 8 ± 1 h d'obscurité, de préférence avec transition progressive.
Alimentation	Ne pas nourrir les poissons 16 h avant l'essai ni pendant l'essai.
Observations	Mort, aspect et comportement des poissons; au moins à 24, 48, 72 et 96 h.
Mesures	Température, pH, OD, au moins au début et à la fin de l'essai (de préférence, chaque jour); conductivité, au moins début de l'essai.
Résultats	Conformément aux précisions fournies ou selon l'objet de l'essai et la substance à expérimenter; il peut s'agir d'établir la CL50 après 96 h (nécessitant des limites de confiance à 95 %) ou d'un essai à concentration unique (pourcentage de mortalité après 96 h ou moins; TL50).
Produit toxique de référence	Phénol et/ou zinc (en équivalents de sulfate); effectuer un essai statique de CL50 après 96 h aussitôt les poissons acclimatés et moins à ultérieurement.
Validité de l'essai	L'essai n'est pas valide si plus de 10 % des poissons meurent ou ont un comportement atypique ou stressé.

Produit Chimiques

Solvants	À utiliser seulement dans des cas particuliers.
Concentration	Il est recommandé de mesurer la concentration au début et à la fin de l'exposition, dans les solutions à teneur supérieure, moyenne et inférieure et dans les solutions de contrôle; si les concentrations diminuent de 20 % ou plus, réévaluer en utilisant un essai à renouvellement continu ou périodique.
Eau de contrôle/ de dilution	Conformément aux précisions fournies ou selon l'objet de l'essai; eau reconstituée s'il faut assurer un degré élevé de normalisation; eau de milieu récepteur pour étudier les effets toxiques locaux; sinon, eau du laboratoire.

Effluents et Lixiviats

Transport et stockage	Transport à la température ambiante (plus de 1°C, moins de 30 °C) ou entre 1 et 8°C si le délai de transport est supérieur à deux jours; les échantillons ne devraient pas geler pendant le transport et devraient être stockés dans l'obscurité entre 1 et 8°C (de préférence à $4 \pm 2^\circ \text{C}$); l'essai devrait commencer dans les trois jours et doit être mis en route dans les cinq jours suivant le prélèvement des échantillons.
Eau de contrôle/ de dilution	Conformément aux précisions fournies ou selon l'objet de l'essai; eau de laboratoire ou milieu récepteur «en amont» pour les essais de surveillance et de conformité.
Solides ou éléments flottants à forte densité	On peut décider de recirculer les solutions d'essai.

Élutriats

Transport et stockage	Procéder à l'extraction dans les sept jours de la réception des échantillons; conserver dans l'obscurité entre 1 et 8°C (de préférence à $4 \pm 2^\circ \text{C}$); effectuer l'essai dans les dix jours suivant la réception des échantillons.
Eau de contrôle/ de dilution	Conformément aux précisions fournies ou selon l'objet de l'essai; eau reconstituée s'il faut assurer un de dilutiondegré élevé de normalisation

Milieus récepteurs

Transport et stockage	Comme pour les effluents et lixiviats.
Eau de contrôle/ de dilution	Conformément aux précisions fournies ou selon l'objet de l'essai; eau du milieu récepteur «en amont» pour l'étude des effets locaux.

-
- * Dans des cas particuliers (p. ex., produits chimiques volatils ou instables en solution), il se peut qu'on doive recourir à des essais à renouvellement continu ou périodique, ou modifier la durée de l'essai.
- ** Si le milieu récepteur est utilisé comme eau de contrôle/de dilution, un contrôle supplémentaire est nécessaire; il faut alors utiliser l'eau de laboratoire non contaminée à laquelle les poissons ont été acclimatés.
- *** Si le pH n'est pas compris dans cet intervalle, les résultats peuvent indiquer une toxicité attribuable à un pH biologiquement nocif.

De préférence, les solutions d'essai devraient être placées selon un ordre aléatoire (Sprague, 1973). Il est recommandé, si nécessaire, de couvrir les réservoirs d'essai avec des plaques de verre ou des grilles propres et non toxiques, afin d'empêcher que les poissons ne s'en échappent. On devrait avoir recours à des plaques de verre si l'on craint que des contaminants en provenance d'autres sources entrent dans les solutions d'essai ou que des substances volatiles s'échappent de celles-ci. La température, l'oxygène dissous et le pH de l'eau des réservoirs devraient être vérifiés et, si cela est nécessaire ou permis, corrigés pour s'établir à des niveaux admissibles avant qu'on y dépose les poissons. La conductivité de chaque solution d'essai devrait également être mesurée et enregistrée à ce moment.

Il est recommandé de prévoir au moins dix poissons par solution d'essai, même si les circonstances peuvent justifier un nombre moins élevé de poissons¹. Les poissons doivent être déposés en nombres égaux dans chaque solution d'essai et de contrôle. Ils peuvent être répartis dans deux réservoirs ou plus, de façon à respecter la densité de chargement maximale requise de $\leq 0,5$ g/L^m. L'ordre selon lequel on ajoute les

¹ La réduction de dix à sept du nombre de poissons par solution d'essai donne lieu à une perte minimale de précision dans le calcul de la CL50 (Douglas *et al.*, 1986). Cette démarche peut s'avérer nécessaire et admissible dans les cas où l'on calcule des CL50 et où l'on ne dispose pas d'assez de poissons pour en utiliser dix par solution.

Lorsque le volume des échantillons est insuffisant pour qu'on maintienne la densité maximale de chargement de poissons ($\leq 0,5$ g/L) en utilisant dix poissons par solution, un nombre de poissons moins élevé pourrait également être utilisé. Cela permettra d'obtenir une réponse exacte, mais moins précise; en revanche, le dépassement de la densité de chargement admissible pourrait entraîner un résultat inexact.

^m Le poids frais total des poissons dans toute solution d'essai, y compris celles de contrôle, ne doit pas être supérieur à 0,5 g/L. Une densité plus faible de chargement de poissons pourrait être couramment utilisée, dans tous les

poissons dans les réservoirs d'essai devrait être établi au hasard au préalable. Chaque poisson doit être utilisé une seule fois comme organisme soumis à l'essai ou comme organisme témoin.

Les poissons du réservoir d'acclimatation ne doivent pas être nourris pour une période d'au moins 16 h avant l'essai, ni pendant l'essai. Afin de réduire le stress, on devrait les transférer le plus rapidement possible du réservoir

cas possibles, afin de réduire l'accumulation de déchets métaboliques et l'appauvrissement du (des) produit(s) toxique(s) de l'eau par les poissons. Une densité optimale de 0,125 g/L a été suggérée (Sprague, 1973).

Une densité supérieure de chargement de poissons peut réduire la toxicité apparente de certains échantillons. Des densités maximales de 0,4 g/L (Davis et Mason, 1973) et de 0,5 g/L (Craig et Beggs, 1979) ont été recommandées pour les essais de quatre jours, parce que des valeurs plus élevées ont entraîné une survie prolongée ou des CL50 supérieures pour les poissons exposés à des effluents ou à des produits chimiques.

Les essais statiques recommandés ici peuvent indiquer une toxicité inférieure à celle que mesurerait un essai à renouvellement continu. Les effluents des usines de pâte kraft blanchie peuvent ne révéler que la moitié de leur toxicité aiguë dans un essai statique, par rapport à un essai à renouvellement continu (Walden *et al.*, 1975). Les effluents très toxiques peuvent présenter une toxicité quatre fois plus grande dans des essais à renouvellement continu, mais la différence peut être faible pour les effluents légèrement toxiques (Loch et MacLeod, 1974).

La densité de chargement recommandée dans le présent document est donc considérée comme un maximum admissible. Comme on réalise des essais statiques, il faut tenir compte du fait que l'utilisation de ce chargement maximal pourrait influencer la toxicité apparente. Dans les deux cas, il s'agit de compromis qui tiennent compte de l'économie d'acheminer des échantillons de petite taille aux laboratoires d'essai. En raison de la variabilité quotidienne des effluents industriels, il serait généralement plus utile de consacrer les ressources disponibles à des essais plus fréquents d'échantillons plus petits, plutôt que de réaliser des essais définitifs mais peu fréquents portant sur de gros échantillons. Pourtant, il faut tenir compte de la possibilité que les essais laissent apparaître une toxicité plus forte dans les cas où les conditions sont supérieures au minimum.

d'acclimatation aux réservoirs d'essai. Il faut éliminer tous les poissons qu'on échappe ou qui sont blessés pendant le transfert. Si les épuisettes entrent en contact avec les solutions d'essai, elles devraient être rincées (avec de l'eau de dilution) entre les transferts. L'eau des seaux de transfert des poissons devrait être aérée au besoin afin de maintenir sa teneur en oxygène dissous entre 80 et 100 % de saturation en air pendant la période nécessaire pour le dépôt des poissons dans les réservoirs d'essai.

4.3 Conditions de l'essai

L'essai doit être statique* (pas renouvellement des solutions pendant l'essai).

La température d'essai devrait être de $15 \pm 1^\circ\text{C}$.

Chaque réservoir d'essai doit contenir au moins 15 cm de solution d'essai. La densité de chargement dans chaque réservoir d'essai ne doit pas dépasser 0,5 g/L.

Les solutions d'essai (y compris les solutions de contrôle) doivent être aérées à raison d'au plus 6,5 mL/min • L.

Il ne faut pas nourrir les poissons pendant l'essai.

L'essai n'est pas valide si plus de 10 % des poissons dans l'eau de contrôle meurent ou laissent apparaître un comportement de nage atypique, par exemple des mouvements convulsifs, une nage rapide à la surface ou une perte d'équilibre (annexe E).

4.3.1 Oxygène dissous et aération

Selon la substance testée, la préaération de chaque solution d'essai, y compris celles de contrôle, dans des conditions définies, immédiatement avant l'introduction des poissons

* Dans des cas particuliers (p. ex., produits chimiques volatils ou instables en solution), il se peut qu'on doive recourir à des essais à renouvellement continu ou périodique, ou encore modifier la durée de l'essai.

utilisés pour les essais, pourrait ou non être recommandée (voir sections 5.2, 6.2 et 7.2).

Dans les cas où la préaération est recommandée (voir sections 5.2, 6.2 et 7.2), chaque solution, y compris la ou les solutions de contrôle, devraient être aérées doucement pendant 30 minutes à raison de $6,5 \pm 1 \text{ mL/min} \cdot \text{L}$. La teneur en oxygène dissous de chaque solution d'essai devrait être mesurée immédiatement après. Si (et seulement si) la valeur mesurée dans une ou plusieurs solutions est inférieure à 70 % ou supérieure à 100 % de saturation en air, il faut poursuivre la préaération au même rythme (c.-à-d. $6,5 \pm 1 \text{ mL/min} \cdot \text{L}$ pendant une période additionnelle ne dépassant pas 90 minutesⁿ. Si l'on a obtenu 70 % de saturation en air dans la solution d'essai de la concentration la plus élevée (ou 100 % de saturation s'il y avait sursaturation) en un temps plus court, l'aération est arrêtée au temps voulu pour y parvenir. Immédiatement après, on doit introduire les poissons dans chaque solution d'essai et mettre en route l'essai, qu'on ait obtenu ou non de 70 à 100 % de saturation dans toutes les solutions d'essai.

Au début de l'essai, l'aération des solutions d'essai (et de contrôle) devrait commencer ou se poursuivre à un débit de $6,5 \pm 1 \text{ mL/min} \cdot \text{L}$. Cette aération devrait se poursuivre pendant la durée de l'essai. L'aération (ou la préaération) des solutions d'essai devrait être assurée au moyen de bulles d'air comprimé — filtré auparavant de façon à être exempt d'huile — passant par des pierres de barbotage propres.

ⁿ L'aération peut éliminer les produits chimiques volatils de la solution ou accroître leur taux d'oxydation et de dégradation en d'autres substances. Cependant, l'aération des solutions d'essai avant l'exposition des poissons peut s'avérer nécessaire en raison de la demande d'oxygène de la substance à expérimenter (p. ex., appauvrissement de l'oxygène dans l'échantillon pendant son stockage). L'aération aide aussi au remélange de la solution d'essai.

Celles dont l'emploi est acceptable sont les suivantes : (i) Aqua Fizzz^{**}, 2,5 cm de longueur, 1,5 cm de diamètre, cylindriques (usage unique); ou (ii) AS1, en verre de silice^{**}, 3,8 cm de longueur, 1,3 cm de largeur, rectangulaires (réutilisables après un nettoyage adéquat)^{***}. Le débit d'aération devrait être vérifié et surveillé au moins quotidiennement au moyen d'un compteur à gaz.

Si, lorsqu'on applique le débit d'aération prescrit, les niveaux d'oxygène dissous auxquels sont exposés les poissons sont ou deviennent inférieurs à 60 % des saturations (OCDE, 1984; EPA, 1985a) et que l'essai vise à établir le degré auquel l'appauvrissement en oxygène peut favoriser la mort des poissons, on peut réaliser un deuxième essai avec l'échantillon (ou une partie de celui-ci) en utilisant un débit d'aération supérieur, suffisant pour maintenir les concentrations en oxygène dissous à au moins 70 % des saturations. On peut aussi réaliser le deuxième essai en faisant appel à de l'oxygène gazeux comprimé, injecté dans chaque solution d'essai à un débit contrôlé ($6,5 \pm 1 \text{ mL/min} \cdot \text{L}$), à la condition qu'il n'y ait pas de sursaturation.

4.3.2 pH

Les essais de toxicité devraient normalement être

effectués sans correction du pH. Il se peut que l'échantillon de produit chimique, d'eau usée ou de milieu récepteur produise, pour une solution d'essai, un pH qui se situe en dehors de l'intervalle de 5,5 à 8,5, et que l'on cherche à évaluer des produits chimiques toxiques plutôt que les effets létaux ou modificateurs du pH; en pareil cas, on devrait corriger le pH des solutions d'essai ou de l'échantillon avant d'y déposer les poissons, ou effectuer parallèlement un deuxième essai (avec correction du pH)^o. Pour ce deuxième essai, avant l'exposition des poissons, le pH initial de l'échantillon ou de chaque solution d'essai^p peut, selon les objectifs de l'essai, être neutralisé (corrigé à une valeur de 7,0) ou ramené à des valeurs correspondant, à 0,5 unité près, au pH de l'eau de dilution. Selon

^o Si l'on ne corrige pas le pH des solutions ou de l'échantillon, c'est essentiellement parce qu'il peut exercer une forte influence sur la toxicité des produits chimiques ou des substances contenues dans les eaux usées. Pour les concentrations (généralement) faibles d'eaux usées qu'on trouve dans les milieux récepteurs après dilution, toute modification du pH naturel (et toute modification concomitante de la toxicité) devrait être acceptée comme partie intégrante de la pollution. C'est pourquoi on en arrive à la conclusion que le pH ne devrait pas être corrigé.

Certains produits chimiques et eaux usées entraînent cependant des niveaux létaux de pH dans les solutions d'essai à concentration élevée, particulièrement dans le cadre d'essais de surveillance ou de conformité portant sur des effluents non dilués. Il semble peu probable que l'expérimentateur cherche essentiellement à savoir si un pH extrême dans un effluent non dilué serait nocif pour les poissons, étant donné que ce pH ne serait pas représentatif des conditions qui prévaudraient après une dilution, même modérée, dans le milieu récepteur. Si le pH en soi présentait un intérêt prépondérant, un essai de toxicité ne serait sans doute pas nécessaire, puisque la létalité d'un pH extrême est bien établie et qu'on pourrait évaluer de façon beaucoup plus économique les risques par une simple mesure chimique. L'expérimentateur cherche généralement à savoir si des substances toxiques sont présentes dans les eaux usées; pour ce faire, il faut éliminer tout masquage dû à une action létale du pH. Ce principe conduit à l'utilisation d'échantillons ou de solutions d'essai à pH corrigé lorsque cela est indiqué. Exactement de la même façon, on normalise la température et l'oxygène dissous dans les essais de toxicité même si les eaux usées elles-mêmes avaient une température de 90 °C ou une teneur en oxygène dissous faible (p. ex., moins de 2 mg/L), car ces deux conditions pourraient être rapidement létales pour les poissons.

^p Pour les essais de produits chimiques ou d'échantillons d'effluents, de lixiviats ou d'élutriats nécessitant une correction du pH, on doit généralement corriger séparément le pH de chaque solution d'essai (y compris les solutions de contrôle). Les essais portant sur des échantillons de milieux récepteurs requièrent normalement la correction du pH d'une aliquote de l'échantillon non dilué, avant la préparation des concentrations d'essai.

^{**} On peut se procurer les pierres Aqua Fizzz (aussi appelées Elite Aqua Fizzz) auprès d'un grand nombre de fournisseurs locaux et de Rolf C. Hagen Inc. (780-467-3302). Pour une description complète de ces pierres de barbotage, consulter le site <<http://www.hagen.com/>> et rechercher les produits A-962 ou A-960. Les pierres en verre de silice sont disponibles auprès de Dynamic Aqua Supply, Surrey (Colombie-Britannique) (604-543-7504), Fish Farm Supply, Elmira (Ontario) (519-669-1096) ou Valox Ltd., Fredericton (Nouveau-Brunswick) (506-458-5430).

^{***} Procédures de nettoyage acceptables pour les pierres en silice AS1: (i) trempage pendant la nuit dans de l'acide nitrique concentré (33 %), suivi d'un rinçage à l'eau du robinet pendant environ 1 h (ou jusqu'à ce que l'eau surnageante ne soit plus acide), puis de 5 rinçages avec de l'eau distillée ou de contrôle et, enfin, trempage pendant 2 h dans de l'eau distillée ou de contrôle, après quoi les pierres peuvent être entreposées à l'état sec; (ii) rinçage à l'eau chaude du robinet, suivi d'un trempage pendant la nuit ou pendant 24 h dans une solution de peroxyde d'hydrogène titrant 500 ppm ($\mu\text{L/L}$), puis d'un rinçage à l'eau du robinet et de 3 rinçages avec de l'eau déchlorée pendant l'équivalent d'une journée de travail et, enfin, purge à rebours à l'eau déchlorée par adduction d'air, après quoi les pierres peuvent être entreposées dans de l'eau déchlorée.

une autre démarche admissible pour ce deuxième essai, on peut ramener le pH de chaque solution d'essai (y compris les solutions de contrôle) à une valeur de 5,5 à 6,0 (si l'échantillon d'essai a ou produit un pH inférieur à 5,5) ou de 8,0 à 8,5 (si l'échantillon a ou produit un pH supérieur à 8,5). Des solutions d'acide chlorhydrique (HCl) ou d'hydroxyde de sodium (NaOH) de titre inférieur ou égal à 1 N devraient normalement être utilisées pour toutes les opérations de correction du pH. Certaines situations (p. ex., des échantillons d'effluents à pouvoir tampon élevé) peuvent exiger l'utilisation de teneurs supérieures d'acide ou de base.

Abernethy et Westlake (1989) fournissent des lignes directrices utiles pour la correction du pH. Il faudrait laisser s'équilibrer, après chaque addition d'acide ou de base, les solutions d'essai ou les aliquotes d'échantillons faisant l'objet d'une correction du pH^p. Le délai nécessaire pour atteindre cet équilibre dépend du pouvoir tampon de la solution ou de l'échantillon. Pour les échantillons d'effluents, il est recommandé de prévoir une durée de 30 à 60 minutes pour la correction du pH (Abernethy et Westlake, 1989). Une fois l'essai lancé, on surveille (section 4.4), sans le corriger, le pH de chaque solution d'essai.

Si l'essai de toxicité vise à mieux comprendre la nature des produits toxiques présent dans un échantillon d'effluent, d'élutriat, de lixiviat ou d'eau d'un milieu récepteur, on utilise souvent la correction du pH parmi un certain nombre de techniques de traitement (p. ex., l'oxydation, la filtration, l'extraction à l'air et l'addition d'agents chélateurs) pour caractériser la toxicité de l'échantillon. Mount et Anderson-Carnahan (1988) comptent la correction du pH parmi neuf techniques d'«Évaluation d'identification de la toxicité» (EIT) qui, lorsqu'on les applique à des échantillons aqueux de toxicité aiguë, constituent des méthodes utiles permettant de déterminer la nature physique ou chimique des produits toxiques et leur prédisposition à la détoxification.

4.4 *Observations et mesures*

Sauf indication contraire, il faudrait observer les poissons dans chaque réservoir d'essai au moins 24, 48, 72 et 96 h après le début de l'essai. Il faudrait également consigner les mortalités ainsi que l'aspect et les comportements anormaux des poissons.

À chaque observation, il faudrait consigner le nombre de poissons morts dans chaque réservoir d'essai et les retirer. Les poissons sont réputés morts quand ils ne laissent apparaître aucun signe d'activité operculaire ou autre et qu'ils ne réagissent pas à une légère poussée. Il faudrait également examiner les poissons afin de détecter les effets toxiques sublétaux évidents (p. ex., l'accroissement du rythme respiratoire ou de la «toux», un comportement de nage irrégulier, la remontée à la surface, la décoloration et la perte d'équilibre), et noter toute différence par rapport aux poissons témoins. L'annexe E donne des exemples de termes à utiliser pour consigner les changements de comportement et d'aspect des poissons.

La teneur en oxygène dissous, le pH et la température de chaque solution d'essai, y compris les solutions de contrôle, doit être mesurée au moins au début et à la fin de l'essai, et de préférence au début de chaque période d'exposition de 24 h. Les mesures finales devraient être faites une fois que l'on a terminé les observations biologiques. La conductivité de chaque solution d'essai doit être mesurée au moins au début de l'essai. Il pourrait être souhaitable de la mesurer chaque jour, puisque son évolution pendant l'essai témoigne de modifications d'ordre chimique.

On doit déterminer, à la fin de l'essai, la longueur à la fourche et le poids frais moyens (\pm l'écart type) des poissons témoins.

4.5 Résultats et calculs

Dans les essais à concentrations multiples, il faut consigner le pourcentage de poissons morts au terme de 96 h d'exposition à chaque solution d'essai de produits chimiques ou d'eaux usées. Il faut calculer la CL50-96 h et ses limites de confiance à 95 % et documenter la méthode de calcul utilisée. Différents programmes informatiques pour le calcul de la CL50 et de ses limites de confiance sont disponibles et peuvent être utilisés. Stephan (1977) a mis au point un programme qui fait appel à trois méthodes (des probits, de la moyenne mobile et binomiale) et l'a adapté aux ordinateurs personnels compatibles IBM. Ce programme en BASIC est recommandé; les personnes qui fournissent une disquette peuvent se le procurer auprès d'Environnement Canada (annexe A), gracieusement de C.E. Stephan. Hubert (1987) offre aussi un programme micro-informatique efficace pour l'analyse des probits, et on peut utiliser d'autres méthodes informatiques et manuelles satisfaisantes (APHA *et al.*, 1989; EPA, 1985a). Des programmes utilisant la méthode abrégée de Spearman-Kärber (Hamilton *et al.*, 1977) existent pour les ordinateurs personnels mais ne sont pas recommandés ici, puisque les personnes qui ne connaissent pas les incidences de l'écrêtement des données de type dose-effet peuvent obtenir des résultats divergents.

Le programme de C.E. Stephan, que nous recommandons, fournit des estimations de la CL50 et des limites de confiance selon chacune des trois méthodes qu'il utilise, si l'ensemble des données comprend au moins deux cas où une partie des poissons sont morts. Pour les données uniformes ou régulières, les trois résultats seront sans doute analogues^q, et les valeurs de l'analyse

des probits devraient être privilégiées et consignées dans le procès-verbal de l'essai.

Les programmes informatiques ont permis d'obtenir des estimations très semblables à celle de la représentation graphique pour les données régulières de la figure 2. Les CL50 (et les limites de confiance à 95 %) se sont établies comme suit:

Analyse des probits de Hubert (1987) 5,56 (4,28-7,21)

Stephan (1977) probits	5,58	(4,24-7,37)
moyenne mobile	5,58	(4,24-7,33)
binomiale	6,22	(1,8-10)

Méthode de Spearman-Kärber :
(Hamilton *et al.*, 1977)

écrêtement de 0 %	5,64	(4,38-7,26)
écrêtement de 10 %	5,73	(4,34-7,58)
écrêtement de 20 %	5,95	(4,34-9,80)

La méthode binomiale n'a pas permis d'estimer de limites de confiance, mais on a choisi deux concentrations d'essai comme limites d'un intervalle à l'intérieur duquel s'inscriraient les limites de confiance véritables.

En ajustant une ligne comme celle de la figure 2, on devrait attribuer relativement plus d'importance aux points qui sont proches de 50 % de mortalité. Si des concentrations successives produisent une série de 0 % de mortalité, cette valeur devrait être utilisée une seule fois pour ajuster la ligne (soit celle qui est la plus proche de la ligne médiane de distribution des données). De même, seule la première d'une série de valeurs successives de 100 % serait utilisée. Le même principe est valable pour les programmes informatiques : une seule valeur successive de 0 % ou 100 % doit être inscrite, car les autres valeurs peuvent entraîner la distorsion de l'estimation de la CL50. On peut se procurer du papier de probabilité logarithmique («log-probit», comme dans la figure 2) auprès des bonnes librairies à vocation technique.

Si l'on souhaite estimer le TL50, on peut tracer un graphique comme celui de la figure 2 en utilisant le logarithme du temps comme axe horizontal. On pourrait utiliser les temps létaux individuels des poissons; cependant, ces temps sont rarement disponibles, puisque les poissons ne font pas l'objet d'une surveillance continue. Le pourcentage cumulatif de mortalité calculé à la suite d'inspections successives est tout à fait satisfaisant pour la représentation graphique; une ligne ajustée à l'oeil conduit à les estimations des limites de confiance suivant les étapes énumérées dans la méthode de Litchfield (1949).

^q La figure 2 repose sur des concentrations de 1,8, 3,2, 5,6, 10 et 18 mg/L, avec des mortalités de 0, 2, 4, 9 et 10 poissons, à raison de 10 poissons par concentration. La ligne ajustée à l'oeil a permis d'estimer la CL50 à 5,6 mg/L.

L'estimation binomiale peut différer légèrement des autres. Si les résultats ne comprennent pas deux cas où une partie des poissons sont morts, les méthodes des probits et de la moyenne mobile ne fonctionnent pas et la méthode binomiale peut être utilisée pour dégager la meilleure estimation possible de la CL50 avec des limites de confiance prudentes (étendues).

On devrait vérifier toute CL50 calculée par ordinateur en examinant, sur une échelle de probabilité logarithmique, la courbe des mortalités après 96 h pour les diverses concentrations d'essai^q (figure 2) (APHA *et al.*, 1989). Tout écart important entre la CL50 estimée au moyen de cette courbe et la CL50 calculée par ordinateur doit être résolu.

Pour les essais à concentration unique, les résultats dépendent de l'objectif de l'essai. Il peut s'agir : a) du pourcentage de mortalité au terme de l'exposition des poissons à l'échantillon non dilué pendant 96 h; b) du pourcentage de mortalité à différents moments, pour la comparaison de la toxicité; ou c) du temps léthal de chaque poisson dans chaque solution.

Si des mesures successives sont effectuées (points b ou c ci-dessus), on peut estimer, si on le souhaite, le temps léthal 50 (TL50) en produisant un graphique semblable à la figure 2, à ceci près que l'axe horizontal est le logarithme du temps, au lieu de la concentration. On peut estimer et comparer les limites de confiance à 95 % en prolongeant d'une étape l'analyse graphique (Litchfield, 1949). Il faut tenir compte du fait que ni le TL50 ni le pourcentage de survie à de faibles durées d'exposition ne constituent des méthodes fiables permettant de juger de la toxicité ultime; par conséquent, les comparaisons reposant sur ces résultats ne donnent que des indications semi-quantitatives.

4.6 Produits toxiques de référence

L'utilisation courante de produits toxiques de référence est nécessaire pour qu'on puisse

évaluer, dans des conditions d'essai normalisées, la sensibilité relative de la population de poissons soumis à l'essai ainsi que la précision et la fiabilité des données obtenues en laboratoire (Environnement Canada, 1990). La sensibilité des poissons aux produits toxiques de référence devrait être évaluée après l'acclimatation d'un nouveau lot de poissons pour une utilisation éventuelle et au moins une fois par mois lorsque la population de poissons acclimatés est utilisée dans des essais de toxicité.

Voici les critères qu'on peut employer pour recommander les produits toxiques de référence convenant à cet essai :

- facilité d'obtention du produit à l'état pur;
- durée de conservation prolongée (stabilité);
- solubilité élevée dans l'eau;
- stabilité en solution aqueuse;
- risque minimum pour l'utilisateur;
- facilité et précision de l'analyse;
- courbe dose-effet satisfaisante pour l'organisme soumis à l'essai;
- influence connue du pH sur la toxicité pour l'organisme d'essai;
- influence connue de la dureté de l'eau sur la toxicité pour l'organisme soumis à l'essai.

On recommande d'utiliser du phénol ou du zinc (préparé à partir de sulfate de zinc) de qualité «réactif» comme produits toxiques de référence pour cet essai. On devrait évaluer la sensibilité des poissons grâce à des essais statiques visant à mesurer la CL50 après 96 h pour l'un de ces produits chimiques ou les deux, en utilisant l'eau de dilution employée couramment par le

laboratoire*. Les conditions de l'essai (y compris le type et la qualité de l'eau de dilution) et les méthodes employées doivent être cohérentes et conformes aux principes énoncés dans le présent document^f.

Un diagramme de contrôle devrait être établi et mis à jour pour chaque produit toxique de référence utilisé. Ce diagramme devrait rapporter la concentration logarithmique en ordonnée et la date de l'essai en abscisse. Chaque nouvelle CL50 pour le produit toxique de référence devrait être comparée aux limites d'avertissement établies; pour être acceptable, la CL50 doit s'inscrire à l'intérieur des limites. La moyenne et l'écart type doivent toujours être calculés sur une échelle logarithmique. La moyenne logarithmique et ses limites d'avertissement inférieure et supérieure (± 2 fois l'écart type) calculées en prenant les valeurs logarithmiques disponibles, sont recalculées pour chaque CL50 successive, jusqu'à ce que les statistiques se stabilisent (EPA, 1985a; Environnement Canada, 1990).

* On peut utiliser de l'eau reconstituée si l'on souhaite atteindre un degré de normalisation supérieur.

^f Étant donné que le pH, la dureté et d'autres caractéristiques de l'eau de dilution peuvent influencer nettement la toxicité de la substance à expérimenter, l'utilisation d'une eau reconstituée normalisée permet d'obtenir des résultats que l'on peut comparer de façon significative avec ceux d'autres laboratoires.

On recommande d'utiliser à cette fin de l'eau reconstituée douce, préparée en ajoutant les quantités suivantes de sels de qualité «réactif» à de l'eau désionisée et filtrée au charbon ou à de l'eau distillée au verre (ASTM, 1980) :

Sel	mg/L
NaHCO ₃	48
CaSO ₄ · 2H ₂ O	30
MgSO ₄	30
KCl	2

L'eau reconstituée devrait être laissée au repos pendant plusieurs jours (EPA, 1985a) et aérée intensément avant d'être utilisée.

Le diagramme de contrôle peut être établi en reportant simplement la moyenne et ± 2 fois l'écart type comme logarithmes, ou si l'on préfère, en les convertissant en valeurs arithmétiques et en reportant la CL50 et ± 2 fois l'écart type sur une échelle logarithmique de concentration.

Si une CL50 s'inscrit en dehors des limites de contrôle, la sensibilité des poissons et le système d'essai sont douteux. Dans la mesure où cela peut se produire 5 % du temps du fait du hasard seulement, une CL50 qui s'inscrit en dehors de ces limites ne signifie pas nécessairement qu'il faut mettre en question la sensibilité de la population de poissons ou la précision des données de toxicité produites par le laboratoire; il s'agit plutôt d'un avertissement que cela peut être le cas. On doit alors vérifier toutes les conditions de détention et d'essai. Selon les constatations faites, il peut s'avérer nécessaire d'entreprendre l'acclimatation d'une nouvelle population de poissons ou de prolonger l'acclimatation de la population existante puis de la soumettre à une nouvelle évaluation avec un ou des produits toxiques de référence) avant de l'utiliser dans les essais de toxicité.

Les solutions mères de phénol devraient être préparées le jour même de l'utilisation. On devrait utiliser du sulfate de zinc (généralement de formule ZnSO₄ · 7H₂O et d'une masse moléculaire égale à 4,3982 fois celle du zinc) pour la préparation des solutions mères du zinc, qui devraient être acides (pH de 3 à 4). On peut conserver les solutions acides de zinc dans l'obscurité à $4 \pm 2^\circ$ C pendant plusieurs semaines jusqu'au moment de l'utilisation. La concentration de zinc devrait être exprimée en mg Zn⁺⁺/L.

Les concentrations des produits toxiques de référence dans toutes les solutions mères devraient être mesurées au moyen de méthodes chimiques appropriées (p. ex., APHA *et al.*, 1989). Au moment de la préparation des

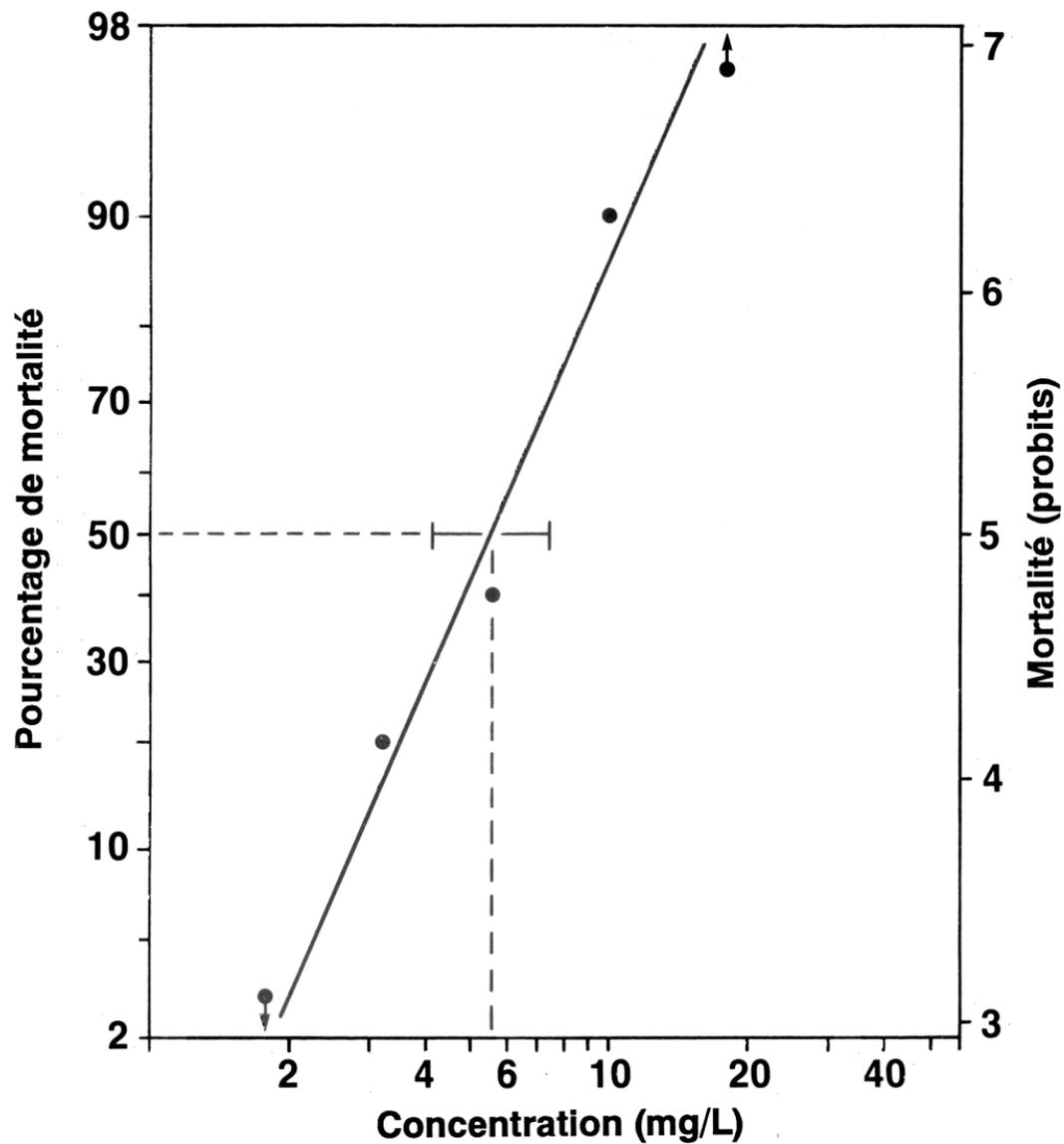


Figure 2 Estimation d'une concentration létale 50 par la représentation graphique des mortalités sur papier de probabilité logarithmique. Dans cet exemple hypothétique, dix poissons ont été exposés à chacune de cinq concentrations. La ligne a été ajustée à l'œil⁹. On peut établir la concentration qu'on prévoit être létale pour 50 % des poissons en suivant la ligne pointillée à partir du niveau de 50 % jusqu'à son intersection avec la ligne ajustée, puis en passant à l'axe horizontal pour une estimation de la CL50 (5,6 mg/L).

solutions d'essai, on devrait prélever des aliquotes au moins dans la solution de contrôle et dans les solutions à teneur inférieure, moyenne et supérieure; ces aliquotes devraient être analysées immédiatement ou stockées pour analyse future, au cas où la CL50 serait atypique (à l'extérieur des limites de contrôle). Si elles sont stockées, on devrait les tenir à l'obscurité, à une température de $4 \pm 2^\circ \text{C}$. Les solutions de zinc et de phénol devraient être préservées (APHA *et al.*, 1989) avant d'être stockées. Les aliquotes stockées nécessitant des mesures chimiques devraient être analysées sans délai aussitôt l'essai de toxicité terminé. Il est souhaitable de mesurer les concentrations dans les mêmes solutions à la fin de l'essai, une fois terminées les observations biologiques. Le calcul de la CL50 devrait être fondé sur les concentrations moyennes mesurées, si elles diffèrent appréciablement (c.-à-d., de plus de 20 %) des concentrations nominales et si les analyses chimiques sont exactes et fiables.

4.7 Considérations juridiques

Les prescriptions complètes et détaillées établies pour les essais de létalité aiguë réalisés à des fins juridiques débordent le cadre du présent document. On doit absolument prendre soin de veiller à ce que les échantillons prélevés et soumis à des essais soient recevables en preuve en cas d'action en justice devant un tribunal. Pour cela, les échantillons légaux doivent : être représentatifs de la substance échantillonnée; ne pas être contaminés par des substances étrangères; avoir des coordonnées précises (date, heure et lieu d'origine); être consignés clairement pour assurer la continuité de la preuve; et être analysés le plus tôt possible après leur prélèvement. Les personnes responsables de l'exécution de l'essai et de l'établissement du procès-verbal doivent assurer la continuité de la preuve en cas d'action en justice (McCafferey, 1979) ainsi que l'intégrité des résultats des essais.

Méthodes particulières pour l'essai de produits chimiques

La présente section énonce des instructions particulières pour l'essai de produits chimiques, qui viennent s'ajouter aux méthodes exposés dans la section 4.

5.1 Propriétés, étiquetage, transport et stockage des échantillons

On devrait obtenir des renseignements sur les propriétés du produit chimique à expérimenter, notamment sa solubilité dans l'eau, sa tension de vapeur, sa stabilité chimique, ses constantes de dissociation et sa biodégradabilité. Il faudrait consulter la fiche signalétique sur les marchandises dangereuses concernant ce produit, s'il en existe une. Quand la solubilité dans l'eau d'un produit chimique soulève des doutes ou des difficultés, les méthodes admissibles utilisées antérieurement pour la préparation de solutions aqueuses de ce produit devraient être recueillies et consignées. Il faudrait également recueillir et consigner les autres renseignements existants, par exemple la formule structurale, le degré de pureté, la nature et le pourcentage des impuretés significatives, la présence et les quantités d'additifs et le coefficient de partage n-octanol/eau^s.

Dès réception des produits chimiques, les contenants doivent être fermés hermétiquement et codé ou étiquetés (p. ex., nom du produit chimique, fournisseur et date de réception). Les conditions de stockage (p. ex., température et protection contre la lumière) sont souvent dictées

^s La connaissance des propriétés du produit chimique aide à déterminer les précautions et exigences particulières requise pour sa manipulation et pour les essais (p. ex., essais dans une installation bien aérée, nécessité d'utiliser un solvant). L'information concernant la solubilité et la stabilité chimique en eau douce est également utile dans l'interprétation des résultats des essais.

par la nature du produit chimique. Les modes opératoires normalisés pour la manipulation et le stockage des produits chimiques devraient être respectés.

5.2 Préparation des solutions d'essai

Das le cas des produits chimiques, on exécute généralement un essai à concentrations multiples afin d'établir la CL50. Il peut s'avérer souhaitable de prévoir des répétitions (deux ou trois) pour chaque concentration d'essai, lorsqu'ils s'agit d'évaluer de nouveaux produits chimiques. Des répétitions peuvent s'avérer nécessaires en vertu des règlements sur l'enregistrement des pesticides et des catégories analogues de produits chimiques.

On peut préparer les solutions en ajoutant des quantités prépesées (à l'aide d'une balance de précision) du produit chimique dans chaque réservoir d'essai, de façon à obtenir les teneurs nominales à expérimenter^t, ou en ajoutant des volumes mesurés d'une solution mère. On devrait préparer les solutions mère en dissolvant le produit chimique à expérimenter dans de l'eau de contrôle/de dilution. Pour les produits chimiques qui ne se dissolvent pas facilement dans l'eau, les solutions mères peuvent être préparées au moyen de la technique de la colonne génératrice (Billington *et al.*, 1988; Shiu *et al.*, 1988) ou, comme second choix, par dispersion ultrasonique. L'expérimentateur devrait être conscient du fait que ce dernier procédé peut donner lieu à des variations de la disponibilité biologique du produit chimique (et, par

^t Cette démarche n'est normalement utilisée que pour préparer des concentrations élevées ou des volumes importants de solutions d'essai. Dans les autres cas, on peut obtenir une plus grande exactitude en préparant une solution mère.

conséquent, de sa toxicité), en raison de la production de gouttelettes non uniformes et de tailles différentes.

On ne devrait pas utiliser de solvants organiques d'émulsifiants ou de dispersants pour accroître la solubilité du produit chimique, sauf dans les cas où ces substances pourraient être formulées avec le produit en cause dans son utilisation commerciale normale. Les cas échéant, on devrait préparer une solution de contrôle supplémentaire renfermant la même concentration d'agent solubilisant que la solution la plus concentrée du produit chimique à expérimenter. Ces agents devraient être utilisés parcimonieusement, leur concentration ne devant pas dépasser 0,5 mL/L dans toute solution d'essai (EPA, 1985b). Si l'on utilise des solvants, il est préférable d'utiliser les produits suivants (EPA, 1985b) : le diméthylformamide, le triéthylèneglycol, le méthanol, l'acétone et l'éthanol.

La teneur en oxygène dissous de chaque solution d'essai, y compris les solutions de contrôle, devrait être mesurée après leur préparation. Cela fait, on devrait soit introduire les poissons et mettre en route l'essai (voir 4.2), soit préaérer chaque solution d'essai (voir 4.3.1) puis introduire les poissons. Dans la plupart des cas, la préaération des solutions d'essai n'est pas nécessaire et ni justifiée (voir note de bas de page «n»). Lorsque la préaération est justifiée (c.à.d., si après préparation, la teneur en oxygène dissous d'une ou de plusieurs solutions d'essai est inférieure à 70 % ou supérieure à 100 % de saturation en air), on devrait suivre les indications pour la préaération des solutions, données en 4.3.1.

5.3 Eau de contrôle/de dilution

L'eau de contrôle/de dilution peut être de l'eau reconstituée, de l'eau douce à laquelle les poissons ont été acclimatés (eau naturelle souterraine ou de surface ou eau municipale

déchlorée), ou un échantillon d'un milieu récepteur, si une situation locale présente un intérêt particulier. Le choix de l'eau de contrôle/de dilution dépend de l'objet de l'essai.

Si un degré élevé de normalisation est nécessaire (p. ex., si la toxicité mesurée d'un produit chimique doit être comparée et évaluée par rapport à des valeurs obtenues ailleurs pour ce produit chimique ou d'autres produits), on devrait préparer de l'eau reconstituée douce (d'une dureté de 40 à 48 mg de CaCO₃ par litre, avec un pH de 7,2 à 7,5) et l'utiliser pour toutes les dilutions et comme eau de contrôle/de dilution (voir note de base de page «r») (EPA, 1985b).

Si l'effet du produit chimique sur une nappe d'eau particulière doit être évalué, le(s) échantillon(s) pourrai(en)t être prélevé(s) d'un site isolé des influences du produit chimique, et utilisé(s) comme eau de contrôle/de dilution^{u, v, w}. Par exemple, il peut s'agir d'évaluer l'effet

^u Les contaminants qui se trouvent déjà dans le milieu récepteur peuvent ajouter leur toxicité à celle du produit chimique ou de l'eau usée à expérimenter. Dans ce cas, de l'eau de dilution non contaminée (eau reconstituée, eau naturelle ou eau municipale déchlorée) donnerait une estimation plus exacte de la toxicité du produit déversé ou appliqué, mais pas nécessairement de son impact total sur le site visé.

^v Il serait souhaitable d'acclimater un groupe de poissons au milieu récepteur avant de l'utiliser dans un essai où ce milieu sert d'eau de contrôle/de dilution, mais cela est rarement réalisable en raison de la nécessité de transporter de forts volumes d'eau. Si cela est possible et opportun, les essais utilisant le milieu récepteur pourraient être réalisés près du site, visé, auquel cas l'acclimatation devrait durer au moins cinq jours.

^w Une solution de rechange (compromis) quant à l'utilisation du milieu récepteur comme eau de contrôle/de dilution consiste à corriger le pH et la dureté de l'eau du laboratoire (ou d'une eau reconstituée) pour qu'ils correspondent à ceux du milieu récepteur. Selon la situation, la correction peut se faire en fonction de moyennes saisonnières ou de valeurs mesurées dans le milieu récepteur à un moment particulier.

toxique sur une nappe d'eau particulière de déversements réels ou potentiels ou d'applications intentionnelles de produits chimiques (p. ex., vaporisation d'un pesticide). L'eau naturelle ou déchlorée du laboratoire peut également être utilisée à cette fin, surtout lorsque des contraintes logistiques rendent peu pratiques le prélèvement et l'utilisation de l'eau du milieu récepteur. L'eau naturelle ou déchlorée du laboratoire à laquelle les poissons d'essai ont été acclimatés peut aussi servir d'eau de contrôle/de dilution dans d'autres situations (p. ex., l'évaluation préalable ou intra-laboratoire de la toxicité du produit chimique).

5.4 Observations et mesures

Pendant la préparation des solutions et à chacune des périodes d'observation prescrites, on devrait examiner chaque solution d'essai afin de détecter la présence et l'évolution du produit chimique (p. ex., couleur et opacité de la solution, précipitation ou floculation du produit chimique). Toute observation devrait être consignée.

Il est souhaitable et recommandé d'analyser les solutions d'essai afin de déterminer les concentrations de produits chimiques auxquelles les poissons sont exposés^x. Pour le faire, on devrait prélever des échantillons dans les solutions d'essai à teneurs supérieure, moyenne et

^x Il n'est pas nécessaire d'effectuer ces analyses dans tous les cas, en raison des limites de l'analyse, des coûts à engager ou de l'existence de données techniques antérieures indiquant la stabilité du produit chimique en solution dans des conditions analogues à celles de l'essai.

Les analyses chimiques sont particulièrement recommandables si (EPA, 1985b) : les solutions d'essai sont aérées; la substance à expérimenter est volatile, insoluble ou forme un précipité en solution; on sait que cette substance est sorbée aux matériaux des réservoirs d'essai; ou on fait appel à un système à renouvellement continu. Certains cas (p. ex., l'essai de pesticides en vue de leur enregistrement) peuvent nécessiter la mesure des concentrations du produit chimique dans les solutions d'essai.

inférieure et dans les solutions de contrôle, au minimum au début et à la fin de l'essai. Ces échantillons devraient être conservés, stockés et analysés au moyen des meilleures méthodes éprouvées permettant d'établir la concentration du produit chimique visé en solution aqueuse.

Si le dosage du produit chimique indique que les concentrations ont fléchi de plus de 20 % pendant l'essai, la toxicité létale aiguë du produit chimique devrait être réévaluée au cours d'un essai à renouvellement périodique ou continu (OCDE, 1984).

Dans tous les essais au cours desquels on mesure les concentrations, la toxicité devrait être calculée et exprimée en fonction des concentrations mesurées, sauf s'il y a de bons motifs de croire que les mesures chimiques ne sont pas exactes. Aux fins de ces calculs, on devrait caractériser chaque solution d'essai par la moyenne géométrique des concentrations mesurées auxquelles les poissons ont été exposés.

5.5 Résultats et calculs

Le résultat des essais de produits chimiques est généralement une CL50 après 96 h. Les méthodes admises pour le calcul de la CL50 et de son intervalle de confiance à 95 % sont énoncées à la section 4.5.

L'essai n'est pas valide si la mortalité dans la solution de contrôle contenant un solvant (ou dans l'eau de contrôle non traitée) est supérieure à 10 %, ou si plus de 10 % des poissons dans l'une ou l'autre des solutions ont un comportement atypique ou stressé (annexe E).

Méthodes particulières pour l'essai d'échantillons d'effluents, d'élutriats et de lixiviats

La présente section énonce des instructions particulières pour l'essai d'échantillons, d'effluents, d'élutriats et de lixiviats; ces instructions viennent s'ajouter aux méthodes exposées dans la section 4.

6.1 *Étiquetage, transport et stockage des échantillons*

Les contenants utilisés pour le transport et le stockage des échantillons d'effluents, de lixiviats et d'élutriats doivent être fabriqués de matériaux non toxiques (p. ex., des contenants de polyéthylène ou de polypropylène fabriqués pour le stockage de l'eau potable ou de l'essence). Ils doivent être neufs, ou encore nettoyés à fond et rincés avec de l'eau non contaminée, et ils devraient également être rincés avec l'échantillon à recueillir. Il faudrait les remplir afin de réduire les vides d'air.

Aussitôt l'échantillon recueillir, chaque contenant doit être rempli, fermé hermétiquement et étiqueté ou codé. L'étiquette devrait porter au moins le type d'échantillon, la source, la date et l'heure du prélèvement, ainsi que le nom des préposés à l'échantillonnage. Les contenants non étiquetés ou non codés livrés au laboratoire ne devraient pas être retenus pour des essais ni, les échantillons livrés dans des contenants remplis en partie puisque les produits toxiques volatils s'évaporent dans le vide d'air. Cependant, si l'on sait que la volatilité ne pose pas de problème, ces échantillons pourraient faire l'objet d'essais, à la discrétion de l'expérimentateur.

L'essai des échantillons d'effluents et de lixiviats devrait être entrepris le plus tôt possible après leur prélèvement. Il devrait débuter dans les trois jours et doit être entrepris au plus tard cinq jours après la fin des prélèvements. Les échantillons

recueillis pour extraction et essai de l'élutriat devraient subir l'essai dans les dix jours suivant leur réception. Les élutriats devraient faire l'objet d'un essai dans les trois jours de la préparation de l'échantillon ou selon les instructions fournies.

Il est souhaitable de réfrigérer les échantillons d'effluents et de lixiviats aussitôt recueillis et pendant le transport. Lorsque cela n'est pas pratique (p. ex., s'il faut expédier de large volumes d'échantillons), on peut les conserver à la température ambiante pendant le transport. Cependant, quand cette température est extrême (c.-à-d. supérieure à 30 ° C ou inférieure à 1° C) ou quand on prévoit des délais de transport supérieurs à deux jours, la température des échantillons devrait être contrôlée (de 1 à 8° C) en cours de transport.

Les échantillons d'effluents et de lixiviats ne devraient pas geler pendant le transport. À l'arrivée au laboratoire, ils peuvent être ramenés immédiatement ou pendant la nuit à 15° C et les essais peuvent être entrepris. Si un stockage plus long s'avère nécessaire, les contenants devraient être entreposés dans l'obscurité entre 1 et 8° C et, de préférence, à 4 ± 2° C.

Sauf précision contraire, les conditions de température pendant le transport et le stockage des élutriats, ainsi que des échantillons destinés à l'extraction aqueuse et à l'essai ultérieur de l'élutriat, devraient être conformes aux indications ci-dessus.

6.2 *Préparation des solutions d'essai*

Les contenants d'échantillons doivent être agités vigoureusement juste avant d'être vidés, afin d'assurer la resuspension des solides décantables.

Les sou-échantillons (c.-à-d., les échantillons répartis dans deux ou plusieurs contenants) doivent être mélangés ensemble, afin d'assurer leur homogénéité. S'il est nécessaire de stocker à nouveau les échantillons, l'échantillon composite (ou une partie de cet échantillon) devrait être retourné dans les contenants de sous-échantillons et stocké (section 6.1) jusqu'au moment de l'utilisation.

Au besoin, la température des échantillons ou des solutions d'essai peut être corrigée à la température requise pour les essais. Pour les réchauffer, utiliser un bain-marie. **Ne pas utiliser** de thermoplongeur vu que cela pourrait altérer les substances chimiques présentes et modifier la toxicité. Pour refroidir les échantillons ou les solutions d'essai, utiliser un bain d'eau froide ou un refroidisseur à immersion.

Chaque essai doit comprendre une ou plusieurs solutions de contrôle. Une fois les solutions préparées et mélangées (voir section 4.1), chaque solution, y compris les solutions de contrôle, devrait être aérée doucement pendant 30 minutes à raison de $6,5 \pm 1 \text{ mL/min}\cdot\text{L}$. Ceci fait, il faudrait revoir les instructions données à la section 4.3.1 (2^{ème} paragraphe) et s'y conformer avant de mettre en route l'essai.

6.3 Eau de contrôle/de dilution

Pour les essais de surveillance et de conformité réalisés sur des échantillons d'effluents ou de lixiviats, on devrait utiliser comme eau de contrôle/de dilution l'eau du laboratoire à laquelle les poissons ont été acclimatés pendant deux ou plusieurs semaines, ou un échantillon d'eau d'un milieu récepteur. Étant donné que les deux sources d'eau peuvent donner des résultats différents, on doit fixer les objectifs de l'essai avant d'effectuer ce choix. Il faudrait également tenir compte des difficultés et des coûts de transport, puisque l'utilisation d'eau du milieu augmente considérablement le volume de liquide à transporter.

L'utilisation d'eau du milieu récepteur comme eau de contrôle/de dilution peut être souhaitable dans certains cas, lorsqu'il faut recueillir des renseignements propres au site visé en ce qui concerne l'effet toxique potentiel d'un effluent, d'un lixiviat ou d'un éluviat sur un milieu récepteur particulier^{u, v, w}. Les conditions de prélèvement, de transport et de stockage des échantillons d'eau de milieux récepteurs devraient être conformes aux dispositions de la section 6.1.

Si un échantillon d'eau d'un milieu récepteur prélevé en amont doit être utilisé comme eau de contrôle/de dilution, une solution de contrôle distincte devrait être préparée à partir de l'eau du laboratoire à laquelle les poissons ont été acclimatés pendant deux ou plusieurs semaines^k. La survie, l'aspect et le comportement des poissons (section 4.4) dans l'eau de contrôle du laboratoire devraient être comparés à ceux des poissons dans l'échantillon d'eau du milieu récepteur.

Les essais nécessitant un degré supérieur de normalisation peuvent faire appel à de l'eau reconstituée comme de contrôle/de dilution^f. Cette eau convient lorsqu'il faut évaluer la toxicité d'un échantillon ou d'une série d'échantillons en comparant les résultats obtenus dans un certain nombre de laboratoires ou dans un même laboratoire où la qualité de l'eau est variable. En pareil cas, il est souhaitable de minimiser toute influence modificatrice attribuable à des différences dans la chimie de l'eau de dilution.

6.4 Conditions de l'essai

Les échantillons d'effluents, de lixiviats ou d'éluviats ne sont normalement pas filtrés ni agités pendant l'essai. Cependant, la présence de solides en suspension dans un échantillon peut causer du stress chez les poissons exposés et se traduire par une létalité aiguë si la concentration de ces solides est suffisamment élevée (p. ex., 2000 mg/L ou plus, Noggle, 1978; McLeay *et al.*,

1987; Servizi *et al.*, 1987). Dans certaines types d'effluents traités, de fortes concentrations de solides biologiques peuvent également concourir à la toxicité des échantillons en raison de la production d'ammoniac ou de nitrites (Servizi et Gordon, 1986). Si l'on est préoccupé par la hausse de la toxicité attribuable à des concentrations élevées de solides en suspension ou décantables dans des échantillons d'effluents, d'élutriats ou de lixiviats, on peut effectuer un essai supplémentaire en maintenant les solides en suspension pendant toute la durée de l'exposition des poissons. On peut employer à cette fin des réservoirs d'essai dotés de parois verticales et d'un fond en forme de cône à pente abrupte (Noggle, 1978; McLeay *et al.*, 1983) ou des réservoirs analogues. Ils permettent d'agiter continuellement les solides en suspension pendant l'essai, par aération à partir du fond conique ou grâce à une pompe qui les aspire au fond et les redistribue à la surface. L'insertion d'un panier dans chaque réservoir d'essai permet d'effectuer une inspection périodique et d'assurer la protection des poissons contre l'appareil de recirculation. Un troisième essai, portant sur une partie de l'échantillon traitée par filtrage ou décantation afin d'éliminer les solides, peut également être mené suivant des méthodes par ailleurs identiques si l'étude vise à quantifier l'apport des solides présents dans l'échantillon à la toxicité létale aiguë.

Si l'échantillon renferme une quantité appréciable de matières flottantes (p. ex., de l'huile ou des surfactants) et que l'apport possible de ces matières à sa toxicité soulève des préoccupations, on peut agiter les solutions pendant toute la durée de l'essai afin d'assurer leur mélange et l'exposition des poissons aux constituants solubles. Les réservoirs coniques de recirculation décrits précédemment peuvent être utilisés, ou comme solution de rechange, des réservoirs d'essai cylindriques dotés d'hélices individuelles (SPE, 1973; Blackman *et al.*, 1978). Il faut alors assurer la protection des poissons contre les hélices.

La toxicité des solutions des certains effluents biotraités (p. ex., eaux usées municipales) contenant des quantités appréciables d'ammoniac peut augmenter pendant l'essai (Clement *et al.*, 1989). Cela peut être causé par une hausse progressive du pH des solutions pendant l'essai (associée à une diminution progressive du CO₂ dissous, attribuable à l'aération), qui fait augmenter la quantité d'ammoniac non ionisé et toxique dans les solutions (CCMRE, 1987). Il se peut que les échantillons d'effluents contiennent une quantité appréciable d'ammoniac ou d'un autre constituant dont la toxicité dépend étroitement du pH, et qu'il y ait lieu de s'inquiéter de la dérive du pH pendant l'essai et de sa contribution à la toxicité de l'échantillon; on peut alors mener, en parallèle, un deuxième essai faisant appel à divers moyens pour réduire ou prévenir la dérive du pH (p. ex., oxygéner les solutions d'essai au lieu de les aérer, ajouter du CO₂ aux solutions d'essai ou aux atmosphères confinées qui les entourent, ou mener les essais dans des contenants scellés à atmosphère d'oxygène).

6.5 Observations et mesures

La couleur, la turbidité, l'odeur et l'homogénéité (c.-à.-d. la présence de matières flottantes ou de solides décantables) de l'échantillon d'effluent, de lixiviat ou d'élutriat devraient être observées au moment de la préparation. La préparation, la floculation, le changement de couleur, le rejet de matières volatiles ou d'autres réactions au moment de la dilution avec l'eau devraient être consignés, tout comme les changements d'aspect des solutions pendant l'essai (p. ex., le moussage, la décantation, la floculation, l'augmentation ou la diminution de la turbidité et les variations de couleur).

Au cours des essais portant sur des solutions fortement colorées ou opaques, ou sur des échantillons produisant de la mousse dans le réservoir d'essai, on devrait inspecter les poissons en les soulevant à la surface de la solution aux intervalles précisés, afin d'observer leur

apparence, leur comportement et leur survie (section 4.4). Il est recommandé, à cette fin, de loger les poissons dans un panier adapté construit d'un matériau non toxique et non abrasif; on peut aussi utiliser des épuisettes, à condition d'éviter de blesser les poissons ou de leur causer un stress excessif pendant la capture. Si l'on utilise des paniers, on devrait en placer un dans chacun des réservoirs contenant les solutions d'essai et de contrôle. Les paniers devraient être assez grands pour permettre aux poissons de se déplacer librement dans tout le réservoir d'essai. Avant usage, chaque panier doit être nettoyé et rincé à fond avec de l'eau de contrôle/de dilution.

6.6 Résultats et calculs

Les essais de surveillance et de conformité devraient normalement porter, au minimum, sur une ou plusieurs portions non diluées de l'échantillon et sur une ou plusieurs solutions de contrôle. Selon les exigences réglementaires précisées, les essais de conformité peuvent faire appel à une seule concentration (100 % d'eaux usées, sauf indication contraire) ou déterminer la CL50 après 96 h (section 4.5).

Les essais réalisés pour la surveillance de la toxicité des effluents, des lixiviats ou des éluutriats peuvent viser à mesurer le pourcentage de mortalité des poissons après 96 h dans une

seule concentration, à établir le TL50 de l'échantillon, dilué ou non, ou encore à mesurer la CL50. Le résultat dépend d'un certain nombre de considérations, notamment les objectifs du programme de surveillance, les exigences de conformité, le coût des essais et les antécédents en matière de survie de poissons dans des eaux usées non diluées.

Les essais de toxicité réalisés à d'autres fins (p. ex., détermination de sources de toxicité à l'intérieur d'une usine, de l'efficacité d'un traitement ou des effets des modifications d'un procédé sur la toxicité) peuvent, selon les objectifs de l'étude, porter sur une seule concentration (100 % ou une dilution appropriée, ainsi qu'un contrôle) ou sur des concentrations multiples. Les essais à concentration unique sont souvent un moyen économique d'établir la présence ou l'absence d'une toxicité létale aiguë ou d'évaluer un nombre important d'échantillons afin d'établir leur toxicité relative. Les résultats de ces essais dépendent toujours des objectifs de l'étude; il peut s'agir de cotes arbitraires de réussite ou d'échec, d'un pourcentage de mortalité de poissons après 96 h ou dans un délai plus rapproché (p. ex., 24 h), ou du temps léthal de chaque poisson dans chaque solution. Les éléments exposés à la section 4.5 sont pertinents dans ce cas.

Méthodes particulières pour l'essai d'échantillons d'eau de milieux récepteurs

Le lecteur trouvera ci-après des instructions pour l'essai d'échantillons de milieux récepteurs, qui viennent s'ajouter aux méthodes exposées dans la section 4.

7.1 *Étiquetage, transport et stockage des échantillons*

Les méthodes d'étiquetage, de transport et de stockage des échantillons devraient être conformes aux dispositions de la section 6.1. Les essais devraient être mis en route le plus tôt possible après le prélèvement des échantillons; ils devraient débiter dans les trois jours et doivent être entrepris au plus tard cinq jours après la fin des prélèvements.

7.2 *Préparation des solutions d'essai*

Les contenants devraient être agités avant d'être vidés, afin d'assurer l'homogénéité des échantillons. Les sous-échantillons devraient être composés comme le prévoit la section 6.2.

La teneur en oxygène dissous de chaque solution d'essai, y compris les solutions de contrôle, devrait être mesurée après leur préparation. Cela fait, on devrait soit introduire les poissons et mettre en route l'essai (voir section 4.2.), soit préaérer chaque solution d'essai (voir 4.3.1) puis introduire les poissons. Dans la plupart des cas, la préaération des solutions d'essai n'est pas nécessaire et ni justifiée (voir note de bas de page «n»). Lorsque la préaération est indiquée (c.à.d., si après préparation, la teneur en oxygène dissous d'une ou de plusieurs solutions d'essai est inférieure à 70 % ou supérieure à 100 % de saturation en air), on devrait suivre les indications pour la préaération des solutions, données en 4.3.1.

7.3 *Eau de contrôle/de dilution*

Pour les échantillons d'eau de milieux récepteurs recueillis dans le voisinage d'un point de rejet d'eaux usées, d'un déversement de produits chimiques ou d'une autre source ponctuelle de contamination possible, on pourrait prélever simultanément de l'eau d'amont et l'utiliser comme eau de contrôle/de dilution pour les échantillons d'aval^{v,w}. Cette eau devrait être prélevée le plus près possible des sources de contamination en cause, mais en amont ou à l'extérieur de leur zone d'influence.

Si l'on utilise de l'eau d'amont comme eau de contrôle/ de dilution, on devrait préparer une solution de contrôle distincte à partir de l'eau du laboratoire à laquelle les poissons ont été acclimatés pendant deux ou plusieurs semaines^k. La survie, l'aspect et le comportement des poissons (section 4.4) dans l'eau de contrôle du laboratoire devraient être comparés à ceux des poissons détenus dans des conditions analogues dans l'eau de contrôle d'amont. Si ces derniers montrent des signes d'épuisement ou de mortalité et si l'on prépare des dilutions de l'eau d'aval pour les essais (parce que l'on s'attend à ce qu'elle soit toxique), on devrait préparer à ce moment un ensemble distinct de dilutions au moyens de l'eau du laboratoire à laquelle les poissons ont été acclimatés. Les expérimentateurs prévoyant cette éventualité devraient recueillir des volumes suffisants d'échantillons d'eau du milieu récepteur pour permettre de préparer ces dilutions supplémentaires.

Des contraintes logistiques, les effets toxiques prévus ou d'autres détails pratiques propres à l'emplacement peuvent empêcher l'utilisation de l'eau d'amont comme eau de contrôle/de dilution.

En pareil cas, l'eau du laboratoire utilisée pour l'acclimatation des poissons devrait servir à cette fin. On pourrait corriger certaines de ses caractéristiques afin de simuler en partie l'eau d'amont^w.

7.4 Observations et mesures

La couleur, la turbidité, le moussage, la précipitation et les autres caractéristiques de l'échantillon et des solutions devraient être observés conformément aux dispositions de la section 6.5, aussi bien pendant la préparation des solutions d'essai que par la suite, pendant les essais eux-mêmes. Ces observations viennent s'ajouter aux observations de base sur les poissons prévues à la section 4.4.

7.5 Résultats et calculs

Les résultats des essais portant sur des échantillons de milieux récepteurs devraient être conformes aux options et aux démarches prévues dans les sections 4.5 et 6.6.

Les essais de surveillance et de conformité devraient normalement porter, au minimum, sur une ou plusieurs parties non diluées d'un échantillon et sur une ou plusieurs solutions de contrôle. Les résultats des essais d'échantillons d'eau de milieux récepteurs peuvent être limités à l'établissement d'un pourcentage de mortalité des poissons à 96 h dans l'échantillon non dilué, ainsi qu'aux données sur le temps léthal, les cas échéant. Lorsque les échantillons d'eau de milieux récepteurs sont probablement toxiques et que l'on souhaite obtenir des renseignements sur le degré de dilution nécessaire pour permettre la survie à court terme des poissons, on devrait effectuer un essai permettant d'établir la CL50 après 96 h. Une ou plusieurs concentrations non diluées (échantillon à 100 %) et au moins quatre dilutions devraient faire l'objet de cet essai, en plus d'une ou de plusieurs solutions de contrôle. En supposant que les données le permettent, la CL50 et ses limites de confiance à 95 % devraient être calculées.

Procès-verbal de l'essai

Le procès-verbal de l'essai devrait décrire les matériaux et les méthodes utilisés, ainsi que les résultats de l'essai. À partir de ce document, le lecteur devrait être en mesure de savoir si, compte tenu des conditions et des méthodes utilisées, les résultats sont admissibles pour l'utilisation prévue.

Les méthodes et conditions communes à une série continue d'essais (p. ex., essais de toxicité courants à des fins de surveillance ou de conformité) et conformes aux dispositions du présent document peuvent faire l'objet d'un renvoi à un procès-verbal général définissant le mode opératoire normalisé. Les sections 8.1 à 8.7 inclusivement énumèrent diverses exigences (identifiées dans le présent rapport par des signets) à consigner dans les procès-verbaux. Les renseignements particuliers à un essai doivent être inclus dans le procès-verbal propre à l'essai. Les renseignements méthodologiques inhérents aux pratiques de laboratoire normalisées utilisées lors de l'application de cette méthode d'essai biologique peuvent figurer dans le procès-verbal général.

Chaque rapport particulier à un essai doit indiquer tout non respect des exigences précisées aux sections 2 à 7 de la présente méthode d'essai biologique et, le cas échéant, en préciser les détails. Des programmes de surveillance particuliers ou des protocoles relatifs aux essais (p. ex., le mode opératoire et les résultats des essais exigeant une correction du pH, une modification de l'aération, ou l'oxygénation) pourraient exiger la mention de certains éléments dans le procès-verbal propre à l'essai ou encore demander à ce que certains renseignements méthodologiques portent la mention «Données à garder en dossier». Les détails concernant la réalisation et les résultats de l'essai qui ne sont pas consignés au procès-verbal devraient être

versés aux dossiers du laboratoire d'essai, de sorte qu'on puisse obtenir les renseignements voulus si une vérification de l'essai s'avère nécessaire.

8.1 *Substance à expérimenter*

- Type, source et description de l'échantillon (produit chimique, effluent, éluviat, lixiviat ou milieu récepteur; lieu et méthode de prélèvement; détails sur la nature, l'aspect et les propriétés de l'échantillon, ainsi que son volume ou son poids).
- Renseignements sur l'étiquetage ou le codage de la substance à expérimenter.
- Détails sur les modalités de prélèvement, de transport et de stockage des échantillons (p. ex., échantillon instantané, discontinu ou composite, description du contenant, et température de l'échantillon à la réception et pendant le stockage).
- Identité des personnes ayant prélevé et/ou fourni l'échantillon.
- Date et heure du prélèvement de l'échantillon, de sa réception à l'installation d'essai et du début de l'essai définitif.

8.2 *Organismes soumis à l'essai*

- Espèce et source.
- Descriptions des conditions de détention et d'acclimatation (installations, éclairage, source et qualité de l'eau, prétraitement de l'eau, débit et méthode d'échange de l'eau, densité de poissons dans les réservoirs de détention et d'acclimatation, température pendant la détention et l'acclimatation, durée

de l'acclimatation, type de nourriture, ration et fréquence d'alimentation, incidence et traitement des maladies).

- Pourcentage hebdomadaire de mortalité dans la population de poissons pendant l'acclimatation.
- Longueur à la fourche et poids moyens des poissons témoins à la fin de l'essai, avec intervalles et nombre d'individus. Densité de chargement (g/L) des poissons.

8.3 Installations et appareils

- Nom et adresse du laboratoire.
- Nom des personnes ayant effectué l'essai.
- Description des systèmes de réglage de l'éclairage et de la température dans l'installation d'essai.
- Description des réservoirs d'essai (taille, forme et type de matériau) et des systèmes et appareils d'aération.

8.4 Eau de contrôle/de dilution

- Type et source(s) de l'eau utilisées comme eau de contrôle/de dilution.
- Type et quantité de tout produit chimique ajouté à l'eau de contrôle/de dilution.
- Détails sur l'échantillonnage et le stockage, si l'eau de contrôle/de dilution provient de la portion «amont» du milieu récepteur.
- Prétraitement de l'eau (correction de la température, dégazage, débit et durée d'aération, etc.)
- Variables de la qualité de l'eau mesurées avant l'essai et au début de l'essai (section 2.4.3).

8.5 Méthode d'essai

- Brève mention de la méthode utilisée, s'il s'agit d'une méthode normalisée (p. ex., conforme au présent document).
- Conception et description de la méthode, si elle est spécialisée (p. ex., recirculation et renouvellement périodique ou continu des solutions d'essai), ou des modifications apportées à la méthodes normalisée.
- Méthode utilisée pour la préparation des solutions mère et des solutions d'essai de produits chimiques.
- Résultats de toute analyse chimique des solutions d'essai et mention des méthodes analytiques utilisées.
- Utilisation d'un essai préalable ou de détermination de l'ordre de grandeur.
- Fréquence et nature des observations effectuées pendant l'essai.

8.6 Conditions de l'essai

- Nombre, concentration, volume et profondeur des solutions d'essai, y compris les solutions de contrôle.
- Nombre de poissons par solution et densité de chargement.
- Photopériode, source lumineuse et éclairage à la surface des solutions d'essai.
- Renseignements sur l'aération des solutions d'essai avant et pendant l'exposition des poissons (débit, durée et mode d'application).
- Description de tout correction du pH des solutions d'essai, y compris la méthode employée et le moment de la correction.

- Résultats de toute mesure chimique des solutions d'essai (p. ex., concentration du produit chimique et teneur en solides en suspension).
- Température, pH, oxygène dissous (mg/L et pourcentage de saturation) et conductivité, d'après les mesures et les observations faites dans chaque solution d'essai.
- Conditions et méthodes de mesure de la CL50 à 96 h ou des produits toxiques de référence.

8.7 Résultats de l'essai

- Aspect des solutions d'essai et modifications constatées pendant l'essai.
- Comportement et aspect des poissons, et nombre et pourcentage des mortalités dans

chaque solution d'essai (y compris la solution de contrôle), selon les données consignées au cours de chaque période d'observation.

Nombre et pourcentage des poissons témoins ayant un comportement atypique ou stressé.

- Résultats de l'essai de détermination de l'ordre de grandeur (s'il y en a eu un).
- Toute valeur CL50 ou TL50 après 96 h (y compris les limites de confiance à 95 %) ayant été établie, y compris une mention de la méthode statistique utilisée pour les calculs.
- CL50 après 96 h et limites de confiance à 95 % établies pour le ou les produits toxiques de référence, à moins d'un mois de l'essai, au moyen du même groupe de poissons que ceux choisis pour l'essai. Valeur moyenne (± 2 fois l'écart type) obtenue pour le ou les mêmes produits à l'installation d'essai au cours d'essais antérieurs.

Références

- Abernethy, S.G. et G.F. Westlake. «Guidelines for pH adjustment of Effluent Samples for Toxicity Testing». Rexdale, ministère de l'Environnement de l'Ontario, septembre 1989. 11 p.
- APHA (*American Public Health Association*) et al., «Toxicity Test Methods for Aquatic Organisms». *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 17^e éd., American Public Health Association, American Water Works Association, and Water Pollution Control Federation, Washington, DC, Part 8000, p. 8-1-8-143 (1989).
- Armstrong, F.A.J. et D.P. Scott. «Photochemical Dechlorination of Water Supply for Fish Tanks with Commercial Water Sterilizers». *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, vol. 31, 1974, p. 1881-1885.
- ASTM. «Standard Guide for the Use of Lighting in Laboratory Testing». E 1733-95, sous presse pour publication dans le *Annual Book of ASTM Standards*, Committee E-47, American Society for Testing and Materials, Philadelphie, PA (1995).
- ASTM (*American Society for Testing and Materials*). «Standard Practice for Conducting Acute Toxicity Tests with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians», *Report E729-80*. Philadelphie, PA, ASTM, 1980. 25 p.
- BHSC (*British Health and Safety Commission*). «Methods for the Determination of Ecotoxicity», Approved Code of Practice. *Notification of New Substances Regulations*, 1982. Report COP 8. Londres, BHSC. 1982. 13 p.
- Billington, J.W., G.-L. Huang, F. Szeto, W.Y. Shiu et D. MacKay. «Preparation of Aqueous Solutions of Sparingly Soluble Organic Substances: I. Single Component Systems». *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 7, 1988, p. 117-128.
- Blackman, R.A., A.F.L. Franklin, M.G. Noton et K.W. Wilson. «New Procedures for the Toxicity Testing of Oil Slick Dispersants in the United Kingdom». *Marine Pollution Bulletin*, vol. 9 1978, p. 234-238.
- Bouck, G.R. «Gasometer: An inexpensive Device for Continuous monitoring of Dissolved Gases and Supersaturation». *Transactions of the American Fisheries Society*, vol. 111, 1982, p. 505-516.
- CCMRE (Conseil canadien des ministres des Ressources et de l'Environnement). «Recommandations pour la qualité des eaux au Canada». Ottawa, Environnement Canada, mars 1987.
- Clement, W.H., G.M. DeGraeve et D.L. Blankenhorn. «A Simple, Practical Method for Conducting Acute and Chronic Aquatic Toxicity Tests Under Controlled pH Conditions». Communication présentée à la 10^e assemblée annuelle de la *Society of Environmental Toxicology and Chemistry*, Toronto, 28 octobre - 2 novembre 1989.
- Craig, G.R., K. Flood, J. Lee, and M. Thomson, «Protocol to Determine the Acute Lethality of Liquid Effluents to Fish», Rexdale, ministère de l'Environnement de l'Ontario, juillet 1983. 9 p.
- Craig, G.R. et G.L. Beggs. «Evaluation of Fish Loading Rates in Regulatory Static Bioassays». *Proceedings of the Fifth Annual Aquatic Toxicity Workshop, November 7-9,*

- 1978, Hamilton, Ontario. Rapport technique du Service des pêches et des sciences de la mer no. 862. Ottawa, Pêches et Environnement Canada, 1979, p. 145-160.
- Dafoe, T., J.H. Carey, S.H. McCrindle, P.G. Wells et R.C.H. Wilson. «Relationships Between the Biological Testing of Industrial Effluents and the Quality of Receiving Waters, Canadian Approach and Examples». *Proceedings of the International Workshop on Biological Testing of Effluents (and Related Receiving Waters)*, Duluth, MN, Sept. 10-14, 1984. Paris, Organisation de coopération et de développement économiques, 1984, p. 245-287.
- Davis, J.C. et B.J. Mason. «Bioassay Procedures to Evaluate Acute Toxicity of Neutralized Bleached Kraft Pulp Mill Effluent to Pacific Salmon». *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, vol. 30, 1973, p. 1565-1573.
- Douglas, M.T., D. O. Chanter, I.B. Pell et G.M. Burney. «A Proposal for the Reduction of Animal numbers Required for the Acute Toxicity to Fish Test (LC50 Determination)». *Aquatic Toxicology*, vol. 8, 1986, p. 243-249.
- Environment Canada, Conservation and Protection, *Document d'orientation sur le contrôle de la précision des essais de toxicité au moyen de produits toxiques de référence*. Rapport SPE 1/RM/12. Ottawa, 1990.
- EPA (*Environmental Protection Agency*). «Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents to Freshwater and Marine Organisms», EPA/600/4-85-013. W.H. Peltier and C.I. Weber (éd.), Cincinnati, EPA, 1985. 215 p. (1985a).
- EPA, «Acute Toxicity Test for Freshwater Fish. Standard Evaluation Procedure», EPA-540/9-85-006, Washington, EPA, Hazard Evaluation Division, 1985, 12 p. (1985b).
- Hamilton, M.A., R.C. Russo et R.V. Thurston. «Trimmed Spearman-Kärber Method for Estimating Median Lethal Concentrations in Toxicity Bioassays». *Environmental Science and Technology*, vol. 11, 1977, p. 714-719.
- Hubert, J.J. «PROBIT2: A Microcomputer Program for Probit Analysis». Guelph, University of Guelph, Department of Mathematics and Statistics, 1987.
- Kendall, R.L. «Taxonomic Changes in North American Trout Names». *Transactions of the American Fisheries Society*, vol. 117, 1988, p. 3210.
- Klontz, G.W., P.C. Downey et R.L. Focht. «A Manual for Trout and Salmon Production». Murray, UT, Sterling H. Nelson & Sons, Inc., 1979.
- Leitritz, E. et R.C. Lewis, «Trout and Salmon Culture (Hatchery Methods)», *California Fish Bulletin*, No. 164, University of California, 1976. 197 p.
- Litchfield, J.T. «A Method for Rapid Graphic Solution of Time-percent Effect Curves». *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, vol. 97, 1949, p. 399-408.
- Lloyd, R. «Factors that Affect the Tolerance of Fish to Heavy Metal Poisoning». *Biological Problems in Water Pollution, Third Seminar, 1962*. Publ. 999-WP-25, Washington, U.S. Public Health Service, 1965, p. 181-187.
- Loch, J.S. et J.C. MacLeod. «Factors Affecting Acute Toxicity Bioassays with Pulp Mill Effluent». Technical Report Series No. Cen/T-74-2. Winnipeg, Environnement Canada, Service des pêches et des sciences de la mer, région du Centre, 1974. 31 p.

- McCaffrey, L. « The Role of Toxicity Testing in Prosecutions Under Section 14(1)(a) of the *Environmental Protection Act*, 1971 and Section 32(1) of the *Ontario Water Resources Act*». *Proceedings of the Fifth Annual Aquatic Toxicity Workshop, Hamilton, Ontario, November 7-9, 1978*. Rapport technique du Service des pêches et des sciences de la mer no 862. Ottawa, Pêches et Environnement Canada, 1979, p. 15-22.
- McGuinness, E.J., «Procedures Manual, Aquatic Bioassay Service Projects», Report AECV-82M1, Alberta Environmental Centre, Vegreville, Alberta, 1982. 56 p.
- McLeay, D.J., A.J. Knox, J.G. Malick, I.K. Birtwell, G. Hartman et G.L. Ennis. «Effects on Arctic Grayling (*Thymallus arcticus*) of Short-term Exposure to Yukon Placer Mining Sediments: Laboratory and Field Studies». rapport technique canadien des sciences halieutiques et aquatiques no 1171, 1983. 134p.
- Mount, D.I. et L. Anderson-Carnahan, «Methods for Aquatic Toxicity Identification Evaluations, Phase I. Toxicity Characterization Procedures». Report EPA-600/3-88/034, Duluth, MN, EPA, 1988.
- Noggle, C. «The Behavioural and Physiological Effects of Suspended Sediment on Juvenile Salmonids». *Proceedings of the Fourth Annual Aquatic Toxicity Workshop, Vancouver, B.C., 8-10 novembre, 1977*. Rapport technique du Service des pêches et des sciences de la mer, no 818. Ottawa, Pêches et Environnement Canada, 1978, p. 54-63.
- OCDE (Organisation de coopération et de développement économiques). *Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques*. Paris, 1984.
- Ontario. «Water Management: Goals, Policies, Objectives and Implementation Procedures of the Ministry of the Environment», édition révisée. Toronto, ministère de l'Environnement de l'Ontario, 1984. 70 p.
- Ontario, «Protocol for Single Concentration Acute Lethality Tests on Liquid Effluent Samples using Rainbow Trout», Rexdale, ministère de l'Environnement de l'Ontario, juin 1989, 10 p.
- Pessah, E. et G.M. Cornwall. «Use of Toxicity Tests in Regulating the Quality of Industrial Wastes in Canada». *Aquatic Toxicology*. J.G. Eaton, P.R. Parrish et A.C. Hendricks (éd.). ASTM STP 707. Philadelphie, ASTM, 1980, p. 130-141.
- Roberts, R.J. et C.J. Shepherd, *Handbook of Trout and Salmon Diseases*, 2 d. Surrey, Fishing News Books Ltd., 1986. 222p.
- Rocchini, R.J., M.J.R. Clark, A.J. Jordan, S. Horvath, D.J. McLeay, J.A. Servizi, A. Sholund, H.J. Singleton, R.G. Watts, and R.H. Young, «Provincial Guidelines and Laboratory Procedures for Measuring Acute Lethal Toxicity of Liquid Effluents to Fish», Victoria, ministère de l'Environnement de la Colombie-Britannique, 1982. 18 p.
- Scott, W.B. et E.F. Crossman. *Poissons d'eau douce du Canada*. Bulletin no 184. Ottawa, office des recherches sur les pêcheries du Canada, 1973.
- Sergy, G. «Recommendations on Aquatic Biological Tests and Procedures for Environment Protection». Edmonton, Environment Canada, juillet 1987.
- Servizi, J. et R.W. Gordon. «Detoxification of TMP and CTMP Effluents Alternating in a Pilot Scale Aerated Lagoon». *Pulp & Paper Canada*, vol 87, no 11, 1986, p. 404-409.

- Servizi, J.A. et D.W. Martens. «Some Effects of Suspended Fraser River Sediments on Sockeye Salmon (*Oncorhynchus nerka*)». *Sockeye Salmon (Oncorhynchus nerka) Population Biology and Future Management*. H.D. Smith, L. Margolis et C.C. Wood (éd.). Publication spéciale canadienne des sciences halieutiques et aquatiques no 96. Ottawa, Pêches et Océans Canada, 1987, p. 254-264.
- Shiu, W.Y., A. Maijanen, A.L.Y. Ng et D. MacKay. «Preparation of Aqueous Solutions: II, Multicomponent Systems - hydrocarbon Mixtures and Petroleum Products». *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 7, 1980, p. 125-137.
- SPE (Service de la protection de l'environnement). *Règlements sur les effluents des fabriques de pâtes et papiers*. Rapport SPE 1-WP-72-1. Ottawa, 1971.
- SPE *Règles d'emploi et d'admissibilité des dispersants pour traiter les nappes de pétrole*. Rapport SPE 1-DIU-73-1, Ottawa 1973.
- SPE. *Règlement et directives sur les effluents des raffineries de pétrole*. Rapport SPE 1-WP-74-1. Ottawa, 1974.
- SPE *Règlement et directives sur les effluents liquides des mines de métaux*. Rapport SPE 1-WP-77-1. Ottawa, 1977 (1977a).
- SPE. *Règlement et directives sur les effluents liquides de l'industries de la viande et de la volaille*. Rapport SPE 1-WP-77-2 Ottawa, 1977 (1977b).
- SPE. *Règlement et lignes directrices sur les effluents des établissements de transformation de la pomme de terre*. Rapport SPE 1-WP-77-4. Ottawa, 1977. (1977c).
- SPE. *Méthode normalisée de contrôle de la toxicité aiguë des effluents*. Rapport SPE 1-WP-80-1. Ottawa, 1980.
- SPE. *Lignes directrices concernant l'homologation des dispersants et leur utilisation pour traiter les nappes de pétrole*. 2^e éd. Rapport SPE 1-EP-1F. Ottawa, 1984.
- Sprague, J.B. «Measurement of Pollutant Toxicity to Fish. I. Bioassay Methods for Acute Toxicity». *Water Resources*, vol. 3, 1969, p. 793-821.
- Sprague, J.B. «The ABCs of Pollutant Bioassay Using Fish». *Biological Methods for the Measurement of Water Quality*. ASTM STP 528, Philadelphie, ASTM, 1973, p. 6-30.
- Stephan, C.E., «Methods for Calculating an LC50», *Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation*, F.L. Mayer and J.L. Hamelink (éd.), ASTM STP 634, Philadelphie, ASTM 1977. P. 65-84.
- UKWRC (*United Kingdom Water Research Centre*), «Acute Toxicity to Fish. Determination of the 96-hour LC50 of Test Substances to the Rainbow Trout Under Flow-through Conditions», Standard Operating Procedure, No. 120 02, Medmenham (R.-U.) UKWRC, 1983. 19 p.
- Walden, C.C., D.J. McLeay et P.D. Monteith. «Comparing Bioassay Procedures for Pulp and Paper Effluents». *Pulp & Paper Canada*, vol. 76, 1975, p. 130-134.
- Wells, P.G. et C. Moyses. *A Selected Bibliography on the Biology of Salmo gairdneri Richardson (rainbow, steelhead, Kamloops trout), with Particular Reference to Studies with Aquatic Toxicants*, 2^e éd. Rapport SPE 3-AR-81-1. Ottawa, SPE, 1981. 90 p.

Membres du Groupe intergouvernemental sur la toxicité aquatique et les adresses de l'administration centrale et des bureaux régionaux d'Environnement Canada

Membres du Groupe intergouvernemental sur la toxicité aquatique (en juillet 1990) : *Gouvernement fédéral* (Environnement Canada)

P. Wells (président actuel)
PE, Dartmouth (N.-É.)

B. Moores
St. John's (T.-N.)

K. Doe
Dartmouth (N.-É.)

W. Parker
Dartmouth (N.-É.)

N. Bermingham
Longueuil (Québec)

C. Blaise
Longueuil (Québec)

G. Elliot
Edmonton (Alberta)

R. Watts
North Vancouver (C.-B.)

K. Day
Institut national de recherche sur les eaux
Burlington (Ontario)

B. Dutka
Institut national de recherche sur les eaux
Burlington (Ontario)

C. Kriz
Direction des programmes fédéraux
Ottawa (Ontario)

D. MacGregor
Direction des produits chimiques commerciaux
Ottawa (Ontario)

P. MacQuarrie
Direction des produits chimiques commerciaux
Ottawa (Ontario)

R. Scroggins
Direction des programmes industriels
Ottawa (Ontario)

G. Sergy
Direction du développement technologique
Edmonton (Alberta)

P. Farrington
Direction de la qualité des eaux
Ottawa (Ontario)

Gouvernements provinciaux

C. Bastien
Ministère de l'Environnement du Québec
Ste-Foy (Québec)

G. Westlake
Ministère de l'Environnement de l'Ontario
Rexdale (Ontario)

W. Young
Ministère de l'Environnement et de la Sécurité publique du
Manitoba
Winnipeg (Manitoba)

K. Lauten
Ministère de l'Environnement et de la Sécurité publique de
la Saskatchewan
Regina (Saskatchewan)

J. Somers
Ministère de l'Environnement de l'Alberta
Vegreville (Alberta)

S. Horvath
Ministère de l'Environnement et de la Colombie-
Britannique
Vancouver (C.-B.)

G. van Aggelen
Ministère de l'Environnement et de la Colombie-
Britannique
Vancouver (C.-B.)

Adresses de l'administration centrale et des bureaux régionaux d'Environnement Canada

Administration centrale

351, boulevard Saint-Joseph
Place Vincent-Massey
Hull (Québec)
K1A 0H3

Région de l'Ontario

4905, rue Dufferin
2^e étage
Downsview (Ontario)
M3H 5T4

Région de l'Atlantique

15^e étage, Queen Square
45, promenade Alderney
Dartmouth (Nouvelle-Écosse)
B2Y 2N6

Région des Prairies et du Nord

Twin Atria No. 2, pièce 210
4999-98^e avenue
Edmonton (Alberta)
T6B 2X3

Région du Québec

105, rue McGill
8^e étage
Montréal (Québec)
H2Y 2E7

Région du Pacifique et du Yukon*

224, rue Esplanade ouest
North Vancouver (C.-B.)
V7M 3H7

* Un programme informatique en BASIC pour le calcul de la CL50 existe et peut être reproduit sur une disquette formatée compatible IBM, fournie par l'utilisateur. Pour se procurer ce programme, communiquer avec le Laboratoire de toxicité aquatique à cette adresse.

Écarts de méthodologie pour l'exécution d'essais de létalité aiguë sur la truite arc-en-ciel*

1. Type de substance à expérimenter

Document	Type de Substance
SPE, 1980	effluent
SPE, 1984	dispersant d'huile
McGuinness, 1982	effluent
Rocchini <i>et al.</i> , 1982	effluent
Craig <i>et al.</i> , 1983	effluent
EPA, 1985a	effluent
EPA, 1985b	pesticide
OCDE, 1984	produit chimique
BHSC, 1982	produit chimique
UKWRC, 1983	produit chimique

2. Type d'essai

Document	Type d'essai
SPE, 1980	statique, à renouvellement périodique ou à renouvellement continu
SPE, 1984	à renouvellement continu
McGuinness, 1982	statique
Rocchini <i>et al.</i> , 1982	statique, à renouvellement périodique ou à renouvellement continu
Craig <i>et al.</i> , 1983	statique, à renouvellement périodique ou à renouvellement continu
EPA, 1985a	statique, à renouvellement périodique ou à renouvellement continu
EPA, 1985b	à renouvellement continu
OCDE, 1984	statique, à renouvellement périodique ou à renouvellement continu
BHSC, 1982	statique, à renouvellement périodique ou à renouvellement continu
UKWRC, 1983	à renouvellement continu

* D'après les documents de méthodologie canadiens, provinciaux et internationaux dont disposaient les auteurs en date d'août 1988.

3. Période d'acclimatation des poissons

Document	Durée
SPE, 1980	≥3 semaines
SPE, 1984	≥3 semaines
McGuinness, 1982	NI*
Rocchini <i>et al.</i> , 1982	≥2 semaines
Craig <i>et al.</i> , 1983	≥10 jours
EPA, 1985a	NI
EPA, 1985b	≥2 semaines
OCDE, 1984	≥12 jours
BHSC, 1982	≥12 jours
UKWRC, 1983	14 jours

4. Type d'eau de contrôle/de dilution

Document	Type de traitement recommandés
SPE, 1980	eau déchlorée (charbon activé, U.V.**)
SPE, 1984	eau déchlorée (charbon activé, U.V.)
McGuinness, 1982	eau déchlorée (charbon activé, U.V.)
Rocchini <i>et al.</i> , 1982	eau du milieu récepteur ou l'équivalent
Craig <i>et al.</i> , 1983	eau déchlorée ou autre
EPA, 1985a	eau du milieu récepteur en amont ou autre
EPA, 1985b	eau reconstituée, douce
OCDE, 1984	eau déchlorée, naturelle ou reconstituée (pH : 6,0 - 8,5; dureté : 50 - 250 mg/L)
BHSC, 1982	eau déchlorée, naturelle ou reconstituée (pH : 6,0 - 8,5; dureté : 50 - 250 mg/L)
UKWRC, 1983	eau de forage, dure (250 - 280 mg/L) pH : 6,0 - 8,5

* Renseignement non indiqué/question non traitée.

** Rayonnement ultraviolet.

5. Correction du pH avant l'essai

Document	Traitement précisé pour le pH
SPE, 1980; SPE 1984	NI
McGuinness, 1982	corriger si pH <6,5 ou >8,5
Rocchini <i>et al.</i> , 1982	NI
Craig <i>et al.</i> , 1983	NI
EPA, 1985a	essai au pH de 7,0 sans correction, si pH <6,5 ou >9,0
EPA, 1985b	NI
OCDE, 1984	aucune correction; reprendre l'essai au pH de l'eau de dilution s'il est différent
BHSC, 1982	aucune correction; reprendre l'essai au pH de l'eau de dilution s'il est différent
UKWRC, 1983	corriger avant l'essai au besoin

6. Température pendant l'essai

Document	Taux d'acclimatation (°C/d)	Température d'essai (°C)
SPE, 1980	≤5	15 ± 1
SPE, 1984	≤2	15 ± 1
McGuinness, 1982	1	15 ± 1
Rocchini <i>et al.</i> , 1982	NI	15 ± 1
Craig <i>et al.</i> , 1983	≤5	15 ± 1
EPA, 1985a	≤6	12 ± 2
EPA, 1985b	NI	12
OCDE, 1984	NI	13–17 (± 1)
BHSC, 1982	NI	13–17 (± 1)
UKWRC, 1983	NI	15 ± 2

7. Aération pendant l'essai

Document	Conditions d'aération
SPE, 1980	5-7,5 mL/min · L
SPE, 1984	aucune aération si l'OD est à ≥ 70 % de saturation; autrement, 5-7,5 mL/min · L
McGuinness, 1982	5-7,5 mL/min · L
Rocchini <i>et al.</i> , 1982	$\geq 7,5$ mL/min · L
Craig <i>et al.</i> , 1983	5-7,5 mL/min · L
EPA, 1985a	débit nécessaire pour maintenir l'OD à ≥ 60 % de saturation
EPA, 1985b	aucune aération
OCDE, 1984	débit nécessaire pour maintenir l'OD à ≥ 60 % de saturation
BHSC, 1982	débit nécessaire pour maintenir l'OD à ≥ 60 % de saturation
UKWRC, 1983	débit nécessaire pour maintenir l'OD à ≥ 60 % de saturation

8. Conditions d'éclairage pendant l'essai

Document	Photopériode (lumière : obscurité)	Intensité (lux)	Type d'éclairage	Aube/ crépuscule (min)
SPE, 1980	14 h : 10 h	20-30	fluorescent	≥ 15
SPE, 1984	14 h : 10 h	20-30	fluorescent	≥ 15
McGuinness, 1982	X	20-30	NI	NI
Rocchini <i>et al.</i> , 1982	14 h : 10 h	NI	NI	≥ 15
Craig <i>et al.</i> , 1983	9-15 h : 15-19 h	20-30	spectre continu	NI
EPA, 1985a	NI	NI	NI	NI
EPA, 1985b	16 h : 8 h	NI	NI	15-30
OCDE, 1984	12 h-16 h : 12-18 h	NI	NI	NI
BHSC, 1982	12 h-16 h : 12-8 h	NI	NI	NI
UKWRC, 1983	14 h : 10 h	NI	tungstène	30

9. Nombre de poissons et de répétitions par solution d'essai

Document	Nombre de poissons	Nombre de répétitions
SPE, 1980	≥ 5	0
SPE, 1984	5	5
McGuinness, 1982	5–10	0
Rocchini <i>et al.</i> , 1982	≥ 10	0
Craig <i>et al.</i> , 1983	10	0
EPA, 1985a	≥ 20	0–1
EPA, 1985b	≥ 10	0
OCDE, 1984	≥ 10	0
BHSC, 1982	≥ 10	0
UKWRC, 1983	≥ 10	0

10. Poids et densité de chargement des poissons soumis à l'essai

Document	Poids (g)	g/L · d pendant quatre jours (essai statique)
SPE, 1980	0,5–10	≤ 0,5
SPE, 1984	2–10	≤ 0,25
McGuinness, 1982	0,5–10	≤ 0,5
Rocchini <i>et al.</i> , 1982	0,2–5	≤ 0,5
Craig <i>et al.</i> , 1983	0,5–5	≤ 0,5
EPA, 1985a	NI (30–90 d)	≤ 0,8
EPA, 1985b	0,5–5	≤ 0,8
OCDE, 1984	NI (5 ± 1 cm)	≤ 1,0
BHSC, 1982	NI (6 ± 2 cm)	≤ 1,0
UKWRC, 1983	0,7–2 (5 ± 1 cm)	NI

11. Produits toxiques de référence

Document	Produits chimiques	Type d'essai
SPE, 1980	NI	-
SPE, 1984	dodécylsulfate de sodium	TL50
McGuinness, 1982	phénol	CL50 (24 h)
Rocchini <i>et al.</i> , 1982	NI	-
Craig <i>et al.</i> , 1983	NI	-
EPA, 1985a	dodécylsulfate de sodium, chlorure des cadmium et pentachlorophénate de sodium	CL50
EPA, 1985b	NI	-
OCDE, 1984	aucune produit recommandé	-
BHSC, 1982	NI	-
UKWRC, 1983	NI	-

*Annexe C***Guide d'alimentation quotidienne de la truite arc-en-ciel* pendant la détention et l'acclimatation****

Poids des poissons (g)	≤4	0,4 - 1,0	1 - 3	3 - 5
Taille de la nourriture (mm)	0,5	0,7	1,0	1,5
Température de l'eau (° C)	Alimentation quotidienne***			
4	2,0	1,4	1,0	0,7
6	3,3	2,3	1,4	1,1
8	4,3	2,7	1,7	1,4
10	4,6	3,2	2,0	1,5
12	4,9	3,3	2,1	1,7
14	5,0	3,4	2,2	1,7
16	5,0	3,5	2,3	1,7

* Chiffres fournis par la PE, région de l'Atlantique (adresse à l'annexe A).

** Il ne faut pas nourrir les poissons au moins 16 h avant l'essai et ni durant celui-ci.

*** Débit d'alimentation quotidien (nourriture sèche), exprimé en pourcentage du poids frais moyen des poissons.

Série logarithmique de concentrations convenant aux essais de toxicité*

Colonne (nombre de concentrations comprises entre 100 et 10, ou entre 10 et 1)**

1	2	3	4	5	6	7
100	100	100	100	100	100	100
32	46	56	63	68	72	75
10	22	32	40	46	52	56
3,2	10	18	25	32	37	42
1,0	4,2	10	16	22	27	32
	2,2	5,6	10	15	19	24
	1,0	3,2	6,3	10	14	18
		1,8	4,0	6,8	10	13
		1,0	2,5	4,6	7,2	10
			1,6	3,2	5,2	7,5
			1,0	2,2	3,7	5,6
				1,5	2,7	4,2
				1,0	1,9	3,2
					1,4	2,4
					1,0	1,8
						1,3
						1,0

* Adapté de Rochinni *et al.*, 1982.

** Une série de cinq concentrations ou plus peut être choisie dans une même colonne. Les points médians entre les concentrations de la colonne (x) se retrouvent dans la colonne (2x + 1). Les valeurs énumérées peuvent représenter des concentrations exprimées en pourcentage (volume ou poids), en mg/L ou en g/L. Au besoin, elles peuvent être multipliées ou divisées par n'importe quelle puissance de 10. On peut se servir de la colonne 1 lorsqu'on est très incertain quant au degré de toxicité. On ne devrait pas employer de concentrations plus espacées (c.-à-d. séparées par un facteur inférieur à 0,3). Pour les essais d'effluents, on gagne rarement beaucoup en précision en choisissant des concentrations dans une colonne à droite de la colonne 3; les écarts moins larges des colonnes 4 à 7 peuvent être utiles à l'occasion pour l'essai de produits chimiques ayant un seuil d'effet abrupte.

Termes convenant à la description de l'aspect et du comportement des poissons (adapté de EPA, 1985a)

Terme	Définition
Tégument	Revêtement épithélial du corps, y compris les branchies
Décollé	- décollement ou perte de parties du tégument
Muqueux	- sécrétions excessives de mucus, surtout évidentes sur les branchies
Hémorragique	- saignement (p. ex., dans les branchies, l'ouverture anale ou les yeux)
Pigmentation	Couleur de la peau, attribuable au dépôt ou à la distribution de pigments
Pâle	- couleur plus pâle que la normale pour l'espèce (telle qu'elle apparaît dans les conditions de l'essai, à l'exclusion de la solution d'essai)
Foncée	- couleur plus foncée que la normale pour l'espèce (telle qu'elle apparaît dans les conditions de l'essai, à l'exclusion de la solution d'essai)
Tachetée	- couleur anormalement variée des poissons, pris individuellement
Comportement général	Réactions observables des poissons soumis à l'essai, individuelles ou en groupes, dans leur environnement
Passif	- en état d'inactivité anormalement faible; immobile ou quasi immobile
Surexcitable	- réagissant à des stimuli beaucoup plus intensément que les poissons témoins
Irrité	- présentant une hyperactivité plus ou moins continue
En surface	- restant très longtemps à la surface
En plongée	- plongeant soudainement au fond du réservoir et y restant très longtemps
Spasmodique	- agité de mouvements brusques (spasmes musculaires) sur une partie ou la totalité du corps
Tétanique	- en état de tétanie, caractérisé par des spasmes tétaniques intermittents des muscles volontaires Normal - en apparence non affecté par la solution d'essai (ou non exposé à elle); conforme à l'aspect normal et aux caractéristiques de comportement habituel de l'espèce dans les conditions d'essai définies
Nage	Autopropulsion progressive dans l'eau par un mouvement coordonné de la queue, du corps et des nageoires
Interrompue	- absence de mouvement
Irrégulière	- évolution caractérisée par un manque d'uniformité, de régularité ou de cohérence; mouvement fluctuant et intégral
Giratoire	- le poisson tourne autour d'un point central ou évolue en spirale autour d'un axe
Éclaboussante	- les poisson nage très vite à la surface, avec des mouvements rapides du corps
Inversée	- le poisson est sur le dos (ou à peu près)
Sur le flanc	- le poisson est retourné à $\pm 90^\circ$ sur le côté par rapport à la position normale du corps
Respiration	Échange physique d'eau à la surface des branchies, se manifestant pas le mouvement des opercules
Rapide	- plus rapide que la normale (rythme respiratoire manifestation plus rapide que celui des poissons témoins)
Lente	- plus lente que la normale (rythme respiratoire manifestation moins rapide que celui des poissons témoins)
Toux	- accroissement (par rapport aux poissons témoins) des cas de toux (circulation inverse dans les branchies, se manifeste par l'ouverture marquée des opercules)
En surface	- le poisson nage à la surface, la bouche ouverte, en pompant de l'eau ou de l'air par les branchies
Irrégulière	- ne se produisant pas à intervalles réguliers (rythmiques)